

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GISLAINE CUSTÓDIO

**RASTREAMENTO DA MUTAÇÃO R337H *TP53*, DIAGNÓSTICO PRECOCE DO
TUMOR DE CÓRTEX ADRENAL E HISTÓRICO DE CâNCER
EM FAMÍLIAS DO ESTADO DO PARANÁ**

CURITIBA
2011

GISLAINE CUSTÓDIO

RASTREAMENTO DA MUTAÇÃO R337H *TP53*, DIAGNÓSTICO PRECOCE
DO TUMOR DE CÓRTEX ADRENAL E HISTÓRICO DE CâNCER
EM FAMÍLIAS DO ESTADO DO PARANÁ

Tese apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Doutor em Ciências
Farmacêuticas, do Programa de Pós-
Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor
de Ciências da Saúde da Universidade
Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Pontarolo
Coorientador: Prof. Dr. Bonald C. Figueiredo

CURITIBA
2011

FICHA CATALOGRÁFICA

Custódio, Gislaine

Rastreamento da Mutação R337H *TP53*, Diagnóstico Precoce do Tumor de Córtex Adrenal e Histórico de Câncer em Famílias do Estado do Paraná / Gislaine Custódio – Curitiba, 2011. 158 f.; 30 cm.

Orientador: Professor Dr. Roberto Pontarolo

Coorientador: Professor Dr. Bonald Cavalcante de Figueiredo

Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Inclui bibliografia

1. Mutação R337H *TP53*. 2. Histórico de Câncer. 3. Carcinoma de plexo coroide. I. Pontarolo, Roberto. II. Figueiredo, Bonald Cavalcante. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

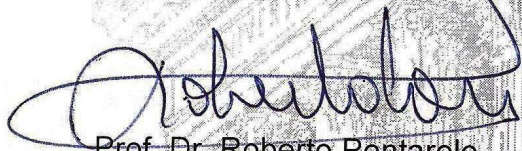
CDD 6145999

TERMO DE APROVAÇÃO

GISLAINE CUSTÓDIO

**Título: RASTREAMENTO DA MUTAÇÃO R337H TP53,
DIAGNÓSTICO PRECOCE DO TUMOR DE CÓRTEX
ADRENAL E HISTÓRICO DE CâNCER EM FAMÍLIAS DO ESTADO
DO PARANÁ**

Tese aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Doutor, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Análises Clínicas.



Prof. Dr. Roberto Pontarolo
Orientador



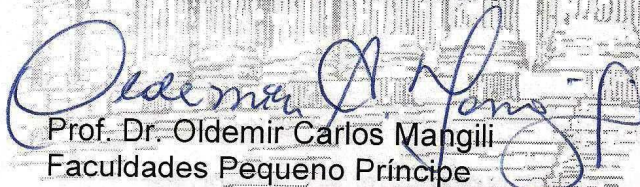
Prof. Dr. Bonald Cavalcante Figueiredo
Co-orientador



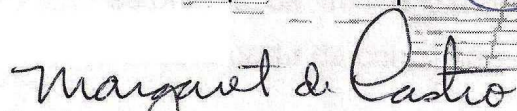
Profª. Drª. Mara Albonei Dudeque Pianovski
Universidade Federal do Paraná



Prof. Dr. Iglencir João Cavalli
Universidade Federal do Paraná



Prof. Dr. Oldemir Carlos Mangili
Faculdades Pequeno Príncipe



Profª. Drª. Margaret de Castro
Universidade de São Paulo

Curitiba, 06 de julho de 2011.

Aos meus filhos Giuliano, Gian Lucca e Maria Gabriela, razão de todo o meu esforço e da minha existência. Prometo dedicar mais tempo e atenção a vocês a partir da conclusão deste trabalho.

Ao meu marido Bonald, exemplo de dedicação, persistência, ética e honestidade.

Aos meus pais Sireli e Tereza, meus maiores exemplos de vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Roberto Pontarolo, meu orientador, por acreditar neste projeto como uma obra capaz de gerar benefícios e valores científicos para o Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas e para nossa Instituição.

Ao meu coorientador, Dr. Bonald Cavalcante de Figueiredo, pelo apoio intelectual, emocional e espiritual em todos os momentos. Obrigada pela paciência, pelo companheirismo e pela atenção com nossa filha e seus enteados.

Aos meus filhos, Giuliano, Gian Lucca e Maria Gabriela, peço desculpas pelos momentos de ausência durante o período deste trabalho e prometo que teremos mais momentos de lazer a partir desta conquista, que só aconteceu devido à presença de vocês em minha vida.

Aos meus pais, Sireli e Tereza, pelo apoio incondicional e por estarem presentes e disponíveis sempre que solicitei ajuda.

Às minhas irmãs Ronise e Patrícia, a quem sempre incentivarei a retomarem os estudos.

À Eloisa C. Pôncio, pela amizade, pelo zelo e pela dedicação aos meus filhos.

Aos amigos, colegas e equipe de trabalho do Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe e Hospital Pequeno Príncipe. Em especial agradeço à Heloisa Komechen, colega de doutorado, pelo apoio, colaboração e amizade e à Maria de Lourdes Torres, por gerenciar as aquisições para o projeto.

Ao Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe (IPPPP), local onde foram realizadas todas as consultas e atendimentos às famílias deste projeto, que trazem suas histórias e esperanças de vida para seus filhos portadores da mutação R337H.

A Associação Paranaense de Apoio à Criança com Neoplasia (APACN) e Universidade Federal do Paraná (UFPR), mantenedoras do Centro de Genética Molecular e Pesquisa do Câncer em Crianças (CEGEMPAC), local que sediou uma parte dos exames de DNA. Aos amigos e colaboradores do CEGEMPAC, especialmente a Elis R. Sade e José Renato S. Barbosa, pelo empenho, pela dedicação e seriedade nos projetos de pesquisa.

A todas as famílias portadoras da mutação R337H *TP53*, que contribuíram com informações valiosas para este trabalho, obrigada pela colaboração.

A todos os profissionais das maternidades no Estado do Paraná e também aos profissionais de Postos de Saúde e Conselho Tutelar, obrigada pelo envolvimento e empenho na localização e no acompanhamento das famílias.

Aos colegas de trabalho do Hospital de Clínicas, Laboratório de Bacteriologia e Análises Clínicas (LABAC) e Laboratório do Hospital Evangélico, pela colaboração, paciência e pelo apoio.

Aos órgãos financiadores deste trabalho, Secretaria de Estado da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior do Paraná (SETI), Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe (Associação Hospitalar de Proteção à Infância Dr. Raul Carneiro), Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Secretaria de Estado da Saúde do Governo do Paraná (SESA).

Aos órgãos parceiros e colaboradores deste trabalho, *Institut de Pharmacologie Moleculaire et Cellulaire* (IPMC), Universidade de Nice (FR), especialmente ao Dr. Enzo Lalli e ao *St. Jude Children's Research Hospital*, Memphis (USA).

A todos a quem conheci e convivi nesses últimos seis anos e que contribuíram para a conclusão deste trabalho.

E acima de tudo, a DEUS, que me dá tantas alegrias, peço que dê força e coragem a toda mãe que vê um filho adoecer gravemente, que preencha ambos os corações com esperança, fé e com a certeza da Sua presença constante, trazendo-lhes a paz e o conforto para cumprirem com os Seus desígnios.

A maior parte deste trabalho foi realizada no
Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe (IPPPP),
Av. Silva Jardim, 1632, Água Verde, Curitiba/PR.

Os primeiros passos foram iniciados no
Centro de Genética Molecular e Pesquisa do Câncer em Crianças
(CEGEMPAC), Av. Agostinho Leão Júnior, 400, Alto da Glória, Curitiba/PR.

*"Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo,
qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim.*

*Cada dia que amanhece assemelha-se a uma página em branco,
na qual gravamos os nossos pensamentos, ações e atitudes.
Na essência, cada dia é a preparação do nosso próprio amanhã.*

*Agradeço por todas as dificuldades que enfrentei;
não fosse por elas, eu não teria saído do lugar.
As facilidades nos impedem de caminhar.
No entanto, as críticas nos auxiliam a evolução.*

*E que possamos sempre nos lembrar que as grandes mudanças não
ocorrem por grandes feitos de alguns e sim,
nas pequenas parcelas cotidianas de todos nós!"*

Chico Xavier

RESUMO

Introdução. A incidência do tumor de córtex adrenal (TCA) é marcadamente alta no Estado do Paraná, onde mais de 95% dos pacientes herdaram a mutação germinativa R337H *TP53* de um dos pais. O desconhecimento da existência da mutação impede uma ação preventiva contra o TCA avançado, assim como a falta de dados sobre o risco para outros tipos de câncer em crianças e adultos dificulta o planejamento epidemiológico e o aconselhamento genético. O presente trabalho foi proposto com o objetivo de esclarecer estes questionamentos. **Métodos:** Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa em seres humanos do Hospital de Clínicas da UFPR, do Hospital Pequeno Príncipe e pela CONEP em 2005 e em 2009 (com novos objetivos). Foram coletadas amostras de sangue periférico para a identificação da mutação R337H *TP53* por meio da técnica de PCR-RFLP. A confirmação da mutação foi feita por meio do sequenciamento do exon 10 do gene *TP53* e pelo achado da mesma mutação em outras pessoas da família. O acompanhamento ambulatorial das crianças com a mutação R337H se baseou nos exames periódicos médicos, em ecografias abdominais e concentrações plasmáticas de hormônios adrenocorticais. Os resultados preliminares de heredogramas das famílias com a mutação R337H revelaram casos de carcinoma de plexo coroide (CPC) com a mutação, o que motivou a pesquisa para esclarecer se há incidência aumentada de CPC no Paraná. **Resultados:** De dezembro de 2005 a março de 2010, 171.649 RN, de um total de 180.000, participaram do rastreamento da mutação R337H *TP53*. Foram identificados 461 RN (0,27%) com a mutação. Dezenove casos de TCA foram diagnosticados no grupo de RN (n=13) ou no grupo de parentes abaixo de 15 anos de idade (n=6) durante esta coorte. Além disso, 34 casos de TCA foram revelados (31 crianças e 3 adultos) no histórico sobre câncer das famílias avaliadas (n=343 famílias). Das crianças que participaram do protocolo de vigilância ambulatorial, oito (2,4%) desenvolveram o TCA. Das crianças restantes portadoras da mutação e que não participaram do protocolo de vigilância, nove (2,5%) desenvolveram o TCA. As crianças com diagnóstico de TCA a partir do protocolo de vigilância ambulatorial apresentaram média de tamanho de tumores estatisticamente menor (apenas no estágio I) do que as que não participaram do protocolo (7 casos nos estágios II ou III, incluindo um óbito). Em 63,3% (14/22) dos pacientes com CPC foi identificada a mutação R337H. Ao contrário, dos 100% de LOH identificado em casos de TCA, o mesmo percentual não aconteceu nos casos de CPC. **Conclusões.** Este estudo demonstra a viabilidade do rastreamento neonatal para a detecção da mutação R337H e tratamento precoce de crianças com TCA, o que sugere que tal procedimento deveria ser incluído no Programa de Triagem Neonatal existente nos Estados brasileiros com uma frequência da mutação semelhante à da população do Paraná (1/371). Esta mutação é responsável por mais de 60% dos casos de CPC, sugerindo uma incidência pelo menos duas vezes maior desta neoplasia no Estado do Paraná do que em outras regiões onde não ocorre a mutação R337H.

Palavras-chave: Tumor de córtex adrenal. R337H *TP53*. PCR-RFLP. Protocolo de Vigilância Ambulatorial. Carcinoma de Plexo Coroide.

ABSTRACT

Introduction. The incidence of adrenocortical tumor (ACT) is remarkably high in Parana State (Southern Brazil), where over 95% of patients inherited the germline R337H *TP53* mutation from a parent. Lack of knowledge about the mutation prevents a preventive action against advanced ACT. Likewise, lack of data on the risk for other types of cancer in children hamper the epidemiological monitoring and genetic counseling. This study was proposed to clarify these questions. **Methods.** This study was approved by the Ethics Committee for Research in Humans from the Hospital de Clínicas from UFPR, from the Pequeno Príncipe Hospital, and by CONEP in 2005 and 2009 (with new goals). Peripheral blood samples were collected for DNA analysis of the R337H mutation of the *TP53* gene using the PCR-RFLP assay. Confirmation of the mutation was performed by sequencing of the *TP53* exon 10 and by the identification of the same mutation in other family members. Outpatient Children with the R337H mutation was based on periodic medical examination, abdominal ultrasound and plasma concentrations of adrenocortical hormones. Preliminary analysis of the pedigrees of the families revealed cases of choroid plexus carcinoma (CPC) with the mutation and encouraged further study to verify whether there is increased incidence of CPC in Paraná state. **Results.** From December 2005 to March 2010, 171.649 newborns from a total of 180.000 were recruited for the screening of the R337H *TP53* mutation. We identified 461 infants (0.27%) with this mutation. Nineteen cases of ACT were diagnosed in the group of newborns ($n = 13$) or in the group of relatives under 15 years of age ($n = 6$) in this cohort. In addition, 34 cases of ACT (31 children and 3 adults) were identified through the family history of cancer ($n=353$ families). Of the newborns who have participated of the surveillance program, eight (2.4%) developed TCA. Of the remaining newborns with the mutation who were not in the surveillance program, nine (2.5%) developed ACT. Children diagnosed with ACT through the surveillance program presented tumors with average size statistically smaller (only stage I) than those who did not attend the surveillance program (7 cases in stages II or III, including one deceased child). In 63.3% (14/22) of the patients with CPC was identified the germline R337H mutation. Unlike the ACT with 100% LOH, a lower percentage of LOH was found in CPC. **Conclusions.** This study demonstrates the feasibility of the neonatal screening to detect and treat precociously the ACT from children with the R337H mutation, suggesting that the neonatal screening for the R337H mutation should be included in the neonatal screening program in the Brazilian states with a similar frequency of mutation found in Paraná state (1/371). This mutation is responsible for more than 60% of the CPC cases in children, suggesting an incidence at least twice higher in Paraná than in other regions without the mutation R337H.

Key words: Adrenocortical Tumor. R337H *TP53*. PCR-RFLP. Surveillance Program. Choroid Plexus Carcinomas.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - TETRAMERIZAÇÃO DA PROTEÍNA p53 R337H.....	28
FIGURA 2 - HEREDOGRAMA DE UMA FAMÍLIA PORTADORA DA MUTAÇÃO R337H NO GENE <i>TP53</i>	30
FIGURA 3 - IMPLANTAÇÃO ESCALONADA DO PROJETO NAS 22 REGIONAIS DE SAÚDE DO PARANÁ.....	40
FIGURA 4 - VALORES DE PREVALÊNCIA POR REGIONAL DE SAÚDE DO PARANÁ.....	60
FIGURA 5 - RASTREAMENTO NEONATAL PARA A MUTAÇÃO R337H <i>TP53</i> E PROTOCOLO DE VIGILÂNCIA AMBULATORIAL.....	66
FIGURA 6 - RESULTADOS DO PROTOCOLO DE VIGILÂNCIA AMBULATORIAL EM CRIANÇAS PORTADORAS DA MUTAÇÃO R337H E QUE DESENVOLVERAM TUMORES ABDOMINAIS.....	74
FIGURA 7 - HEREDOGRAMAS DE 3 FAMÍLIAS PORTADORAS DA MUTAÇÃO R337H <i>TP53</i> ILUSTRANDO OS PADRÕES DE LOH ENCONTRADOS.....	81

LISTA DE QUADROS E TABELAS

QUADRO 1 - PROTOCOLO DE AMPLIFICAÇÃO DO DNA GENÔMICO POR PCR.....	47
TABELA 1 - DADOS DEMOGRÁFICOS DO ESTADO DO PARANÁ POR REGIONAL DE SAÚDE E PREVALÊNCIA DA MUTAÇÃO R337H <i>TP53</i>	59
TABELA 2 - ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS OBTIDOS E ESPERADOS POR REGIONAL DE SAÚDE DO ESTADO DO PARANÁ.....	62
TABELA 3 - RESULTADOS ENCONTRADOS POR REGIONAL DE SAÚDE DO ESTADO DO PARANÁ.....	64
QUADRO 2 - DADOS CLÍNICOS E BIOLÓGICOS DE CRIANÇAS QUE DESENVOLVERAM O TCA DURANTE O PERÍODO DO ESTUDO.....	69
TABELA 4 - ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DOS CASOS DE TCA.....	71
QUADRO 3 - PRINCIPAIS TIPOS DE TUMORES ENCONTRADOS NAS FAMÍLIAS EM ACOMPANHAMENTO.....	75
TABELA 5 - CLASSIFICAÇÃO DAS FAMÍLIAS DE ACORDO COM O HISTÓRICO DE CÂNCER.....	77
QUADRO 4 - HISTÓRICO DE CÂNCER NAS FAMÍLIAS DE CRIANÇAS POSITIVAS PARA R337H QUE DESENVOLVERAM CPC.....	79
QUADRO 5 - SOBREVIDA E HISTÓRICO DE CÂNCER EM FAMÍLIAS COM CASOS DE CPC OU Pp NEGATIVOS PARA A MUTAÇÃO R337H.....	83
QUADRO 6 - NÚMERO APROXIMADO DE TESTES REALIZADOS PARA A PESQUISA DA MUTAÇÃO R337H <i>TP53</i> NO ESTADO DO PARANÁ.....	84

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

APACN	-	Associação Paranaense de Apoio à Criança com Neoplasia
CEGEMPAC	-	Centro de Genética Molecular e Pesquisa de Câncer em Crianças
CEP	-	Comitê de Ética em Pesquisa
CHC	-	Carcinoma Hepatocelular
CNPq	-	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
COG	-	Children Oncology Group
CONEP	-	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
CPC	-	Carcinoma de Plexo Coroide
FC	-	Fibrose cística
FEPE	-	Fundação Ecumênica de Proteção ao Excepcional
HAC	-	Hiperplasia Adrenal Congênita
<i>HhaI</i>	-	Enzima de restrição isolada do <i>Haemophilus haemolyticus</i>
HPP	-	Hospital Pequeno Príncipe
HPV	-	Papiloma Vírus Humano
IARC	-	International Agency for Research on Cancer
IGF1R	-	Receptor do fator 1 de Crescimento Insulina- <i>símile</i>
IGF-2	-	Fator de crescimento Insulina- <i>símile</i> 2
IQ	-	Imunoistoquímica
IPPPP	-	Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe
IRT	-	Tripsinogênio imunoreativo
LFS	-	Li-Fraumeni- <i>símile</i>
LOH	-	Perda de heterozigose
pb	-	Pares de bases
PNTN	-	Programa Nacional de Triagem Neonatal
Pp	-	Papiloma de plexo coróide
PPG	-	Programa de Pós-Graduação
p53	-	Proteína p53
R337H <i>TP53</i>	-	Mutação R337H no gene <i>TP53</i>
RFLP-PCR	-	Restriction Fragment Length Polymorphism-PCR
RM	-	Região Metropolitana
RMN	-	Ressonância Magnética Nuclear
RN	-	Recém-nascido

SDHEA	- Sulfato de dehidroepiandrosterona
SESA	- Secretaria de Estado da Saúde do Governo do Paraná
SETI	- Secretaria de Estado da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior do Paraná
SF-1	- Fator esteroideogênico 1
SLF	- Síndrome de Li-Fraumeni
SV40	- Vírus Símian 40
TC	- Tomografia computadorizada
TCA	- Tumor de Córtex Adrenal
TCLE	- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TSD	- Teste de Supressão com Dexametasona
TSV	- Variação Estrutural Total
UFPR	- Universidade Federal do Paraná

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	18
2.1 OBJETIVO GERAL	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3 REVISÃO DA LITERATURA	19
3.1 O TCA EM CRIANÇAS: EPIDEMIOLOGIA E ASPECTOS CLÍNICOS	19
3.2 ASPECTOS MOLECULARES DO TCA	21
3.3 PERDA DO <i>IMPRINTING</i> DE <i>IGF-2</i>	31
3.4 CARCINOMA DE PLEXO COROIDE EM CRIANÇAS NO ESTADO DO PARANÁ	31
3.5 IMPACTOS SOCIAIS, ÉTICOS E ECONÔMICOS DO RASTREAMENTO NEONATAL	33
4 MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1 POPULAÇÃO DE ESTUDO	37
4.2 COLETA DAS AMOSTRAS DE SANGUE PARA A PESQUISA DA MUTAÇÃO R337H <i>TP53</i>	37
4.3 IMPLANTAÇÃO DO PROJETO	38
4.4 ENVIO DAS AMOSTRAS DE SANGUE PARA ANÁLISE NA CIDADE DE CURITIBA	41
4.5 TERMOS DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)	42
4.5.1 Consentimento para Teste no Sangue do RN	42
4.5.2 Consentimento para Acompanhamento do RN pelo Médico Indicado	42
4.5.3 Consentimento para Teste em Parentes Menores de 15 anos de um RN com a Mutação R337H <i>TP53</i> Confirmada	43
4.5.4 Consentimento para Teste em Parentes de 15 a 18 anos de um RN com a Mutação R337H <i>TP53</i> Confirmada	43
4.5.5 Consentimento para Teste em Parentes Maiores de 18 Anos de um RN com a Mutação R337H <i>TP53</i> Confirmada	43
4.5.6 Consentimento para Análise de Perda de Heterozigose (LOH) em Crianças	43
4.5.7 Consentimento para Análise da Perda de Heterozigose (LOH) em Adultos	43
4.5.8 Consentimento para Análise da Perda de Heterozigose (LOH) em Crianças Diagnosticadas com Outros Tipos de Tumores	44
4.6 ANÁLISE DO DNA E ACOMPANHAMENTO DOS RN COM RESULTADO POSITIVO PARA A MUTA�O	44
4.7 PROTOCOLOS PARA ANÁLISE DO DNA	45
4.7.1 Prepar�o das Amostras para a Detec�o da Muta�o R337H <i>TP53</i> em Sangue Periférico	45
4.7.2 Detec�o da Muta�o R337H <i>TP53</i> em Amostras de CPC	48
4.8 ACONSELHAMENTO GENÉTICO	49
4.9 PROCOTOLO DE VIGILÂNCIA AMBULATORIAL DOS RN PORTADORES DA MUTA�O R337H <i>TP53</i>	52
4.10 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO DOS SUJEITOS VOLUNTÁRIOS	54
4.11 ANÁLISE DOS RISCOS E BENEFÍCIOS	54
4.12 DECLARA�O DE USO ESPECÍFICO DO MATERIAL COLETADO	54
4.13 ANÁLISES ESTATÍSTICAS PARA R337H <i>TP53</i> E TCA	55
4.14 ANÁLISES ESTATÍSTICAS PARA R337H <i>TP53</i> EM CPC	56

4.15 FINANCIAMENTO.....	57
5 RESULTADOS	58
5.1 PREVALÊNCIA DA MUTAÇÃO R337H <i>TP53</i> NO ESTADO DO PARANÁ	58
5.2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E BIOLÓGICAS DOS TCA DIAGNOSTICADOS DURANTE ESTE ESTUDO	67
5.3 AVALIAÇÃO LABORATORIAL DAS CRIANÇAS PORTADORAS DA MUTAÇÃO R337H <i>TP53</i>	72
5.4 HISTÓRICO DE CÂNCER EM FAMÍLIAS QUE PARTICIPARAM DO RASTREAMENTO NEONATAL	75
5.5 AVALIAÇÃO MOLECULAR DE CPC EM CRIANÇAS.....	77
6 DISCUSSÃO	85
7 CONCLUSÕES	100
REFERÊNCIAS	101
ANEXOS	111

1 INTRODUÇÃO

O Tumor de Córtex Adrenal (TCA) pediátrico é um tumor maligno raro e potencialmente fatal. Em regiões com um registro populacional confiável para tumores pediátricos, a incidência do TCA é de aproximadamente um caso para cada 3 milhões de indivíduos abaixo de 15 anos de idade (PARKIN *et al.*, 1988; ALTEKRUSE *et al.*, 2009). Na década de 60, MARIGO; MULLER; DAVIES (1969) reportaram um aumento na frequência do TCA pediátrico em um hospital público da cidade de São Paulo. Nas quatro décadas seguintes, muitos estudos baseados nos registros de dados de hospitais e registros populacionais nos Estados de São Paulo e do Paraná, confirmaram aquela observação e sugeriram que a incidência deste tumor no Paraná estaria 15 vezes mais alta do que em qualquer outro lugar (PIANOVSKI *et al.*, 2006a).

Em função de as características clínicas, epidemiológicas e biológicas dos pacientes brasileiros com TCA serem muito similares às de crianças diagnosticadas com TCA no contexto da síndrome de Li-Fraumeni (SLF), postulou-se que esses pacientes poderiam também segregar uma mutação germinativa no gene *TP53*. De fato, mais de 95% das crianças com TCA no Estado do Paraná são portadoras de uma mutação de ponto no exon 10 do gene *TP53*, a qual codifica uma histidina no lugar de uma arginina (R337H), no domínio de dimerização da proteína p53 (RIBEIRO *et al.*, 2001). Em ensaios convencionais para avaliar a função da p53, a atividade da proteína mutante é similar à da proteína selvagem, mas sob certas condições *in vitro*, sua atividade parece estar comprometida (DIGIAMMARINO *et al.*, 2002). A mutação R337H elimina um site do DNA que é reconhecido pela endonuclease de restrição isolada do *Haemophilus haemolyticus* (*HhaI*), a qual cliva o alelo selvagem do *TP53*, mas não o cliva na presença da mutação R337H. Um ensaio de PCR para amplificar o DNA, seguido de digestão pela *HhaI*, constitui um método rápido, preciso e barato para identificar o alelo mutado em uma gota de sangue coletada em papel de filtro (Cartão DNA, MGM Assessoria Biológica) (CUSTODIO *et al.*, 2011a).

Como a detecção precoce e ressecção completa do tumor estão associadas com altas taxas de cura e sobrevida de aproximadamente 90%, sobretudo para TCA abaixo de 200g de peso (MICHALKIEWICZ *et al.*, 2004), formulou-se a hipótese de que o rastreamento neonatal, em conjunto com um programa de vigilância

ambulatorial para detectar marcadores, imagens ou os primeiros sinais do TCA em portadores da mutação R337H, poderia diagnosticar precocemente o TCA. Neste estudo foi descrita a viabilidade de implementação de um rastreamento neonatal para a detecção do alelo R337H *TP53* no Estado do Paraná e os resultados preliminares do programa de vigilância ambulatorial para a detecção e para o tratamento precoce do TCA em crianças.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar se o rastreamento da mutação R337H em recém-nascidos (RN) e em seus familiares, abaixo de 15 anos de idade, portadores da mesma mutação, associado com a avaliação periódica de marcadores de TCA, pode aumentar a probabilidade de cura para crianças que desenvolvem o TCA, bem como auxiliar na identificação e orientação de adultos em relação ao risco para outros tipos de câncer.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Estimar a prevalência da mutação R337H *TP53* em RN para todo o Estado do Paraná.

Verificar se as crianças que participam do programa de vigilância ambulatorial para diagnóstico precoce de TCA são beneficiadas com maior probabilidade de cura.

Identificar a penetrância da mutação R337H para crianças abaixo de 5 anos de idade (duração da coorte do presente estudo).

Identificar a incidência do TCA para crianças abaixo de 5 anos de idade.

Verificar a existência de algum outro tipo de câncer pediátrico com incidência elevada e associado à mutação R337H, e se os casos encontrados apresentam perda de heterozigose, como acontece no TCA.

Identificar se as famílias com a mutação R337H apresentam histórico de câncer familiar (como a maioria das famílias com mutação no gene *TP53*) e qual seria o perfil quanto ao tipo e à frequência de câncer predominantes.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 O TCA EM CRIANÇAS: EPIDEMIOLOGIA E ASPECTOS CLÍNICOS

Nos Estados Unidos, os tumores pediátricos correspondem a somente 3% de todos os casos de câncer, indicando que são muito raros quando comparados com a incidência de outros tumores em adultos. No entanto, a principal doença que causa a morte de crianças nos Estados Unidos é o câncer (JEMAL *et al.*, 2003).

O TCA em crianças é raro e ocorre em uma incidência de 0,3 / milhão de crianças abaixo de 15 anos de idade (ALTEKRUSE *et al.*, 2009). Com base na classificação histológica de LEVINE (1997), adotada pela Agência Internacional para Pesquisa de Câncer (*International Agency for Research on Cancer - IARC*), e nas informações isoladas de vários países (MALKIN *et al.*, 1990; EL-DEIRY *et al.*, 1992; DONEHOWER *et al.*, 1992; FUNK *et al.*, 1992; JACKS *et al.*, 1994; LEVINE *et al.*, 1995; HOLLSTEIN *et al.*, 1996; FORD *et al.*, 1998; DESANDES *et al.*, 2004), constata-se que existe uma substancial diferença geográfica na incidência do TCA. A incidência do TCA na França é 18 vezes mais baixa do que no Estado do Paraná (DESANDES *et al.*, 2004). As faixas etárias de maior suscetibilidade ao TCA estão entre 0 e 4 anos de idade e a partir da quarta década de vida (WAJCHENBERG *et al.*, 2000; MICHALKIEWICZ *et al.*, 2004; PEREIRA *et al.*, 2004; RIBEIRO; FIGUEIREDO, 2004). Em crianças abaixo de 5 anos de idade, observa-se uma frequência maior do TCA em meninas do que em meninos, na razão de 4:1 (RIBEIRO *et al.*, 1990).

Por causa de sua raridade, a história natural de TCA na infância, em diferentes regiões geográficas, não é bem conhecida; contudo, os relatos de diagnóstico são comuns no Paraná onde existem muitos casos deste tumor. Em uma mesma região geográfica, o TCA é clinicamente heterogêneo, incluindo subtipos hereditários ou esporádicos (FUNK *et al.*, 1992; FORD *et al.*, 1998). As consequências à exposição, em longo prazo, aos andrógenos secretados pelo tumor (característica de mais de 85% dos casos), ainda passam despercebidas por muitos pediatras. No caso dos Estados do Paraná e São Paulo, onde se registram as maiores proporções de casos de TCA em crianças com a mutação R337H (PIANOVSKI *et al.*, 2006a; SEIDINGER *et al.*, 2011), existe a expectativa de que um teste de DNA permita encontrar um número expressivo de crianças antes do aparecimento dos sinais e sintomas do TCA (considerando que mais de 50% dos

casos são diagnosticados nos primeiros três anos de idade). Médicos e pais consultam frequentemente os pesquisadores sobre os cuidados médicos que devem ser tomados quanto ao TCA na infância. Em geral, nenhuma informação significativa sobre esta doença é fornecida devido à escassez de dados esclarecedores.

A análise de 254 casos de TCA no Estado do Paraná permitiu uma revisão da clínica, epidemiologia, tratamentos em uso e dados sobre a sobrevida desses pacientes (MICHALKIEWICZ *et al.*, 2004). Os casos de TCA apresentaram manifestações clínicas semelhantes às de outros países, onde predominam outras mutações no gene *TP53* e outras alterações genéticas. A principal manifestação clínica foi a virilização, observada em aproximadamente 90% das crianças. A forma mista, na qual a virilização estava associada com a síndrome de Cushing, aconteceu em cerca de 40% dos casos. Os tumores não funcionantes corresponderam a aproximadamente 5% dos casos e as manifestações clínicas mais raras incluíram a síndrome de Cushing isolada, a síndrome de Conn e a síndrome feminizante (MICHALKIEWICZ *et al.*, 2004; PEREIRA *et al.*, 2004). O principal diagnóstico diferencial do TCA é a Hiperplasia Adrenal Congênita (HAC) (HOEPFFNER *et al.*, 2008). Nesta doença, observa-se uma diminuição da produção de glicocorticóides, com ou sem a alteração dos mineralocorticóides, além de um aumento dos andrógenos das adrenais, levando a manifestações clínicas tais como virilização, puberdade precoce e perda da estatura final. Na HAC, por deficiência da enzima 21 hidroxilase, verifica-se um aumento nos níveis de precursores adrenais, sobretudo da 17-hidroxiprogesterona e da androstenediona.

Estudos histológicos caracterizaram os tumores como carcinomas (85%) ou adenomas (15%). Cerca de 20 a 30% dos pacientes apresentam a doença em estadio avançado, de 10 a 15% em estadio II e de 55 a 70% em estadio I, este último com maior possibilidade de cura (MICHALKIEWICZ *et al.*, 2004). Foram referidos poucos casos de outros tipos de câncer nos familiares (pulmão, mama, sistema nervoso central, esôfago, intestino, ovário e leucemias), os quais também não são mais frequentes que em famílias da população geral sem TCA (FIGUEIREDO *et al.*, 2005).

Cirurgia é a forma mais comum de tratamento para TCA, sem nenhum protocolo quimioterápico eficiente até o momento (FIGUEIREDO *et al.*, 2004, RODRIGUEZ-GALINDO *et al.*, 2005). O melhor protocolo é bastante agressivo e inclui quatro fármacos, permitindo a cura de menos de 10% dos casos de TCA

avanzado (ZANCANELLA *et al.*, 2006). O melhor resultado é determinado pelo sucesso da cirurgia na retirada completa do tumor sem adicionais complicações (isto é, sem a ruptura da cápsula tumoral ou contaminação do peritônio com células tumorais, e sem invasão de vasos, o que é observado em 20% dos casos) e é associado com a sobrevida livre de doenças. Por outro lado, a remoção incompleta do tumor ocorre em aproximadamente 50% dos casos e é quase sempre fatal.

Sendo a detecção precoce essencial para a cura, a tarefa mais difícil é chegar até o portador da mutação para lhe oferecer um plano de “prevenção contra o diagnóstico tardio”, ou seja, encontrar o tumor logo no início do estadio I, retirá-lo totalmente e alcançar a cura em quase 100% dos casos.

3.2 ASPECTOS MOLECULARES DO TCA

A proteína p53 humana é composta por 393 aminoácidos (aa) e se parece, estruturalmente, com um ativador transcricional (LEVINE, 1997). A porção amino terminal (142 aa) possui aminoácidos altamente ácidos que são necessários para a interação com fatores associados à transcrição de outras proteínas (como Mdm2). A porção carboxila-terminal (aa 311-393) é rica em aminoácidos básicos e contém três sinais nucleares, um domínio para dimerização / oligodimerização e um domínio regulatório negativo que modula a atividade do gene *TP53*. O domínio central (aa 102-290) é responsável pela sequência específica de ligação ao DNA. O *TP53* normal liga-se seletivamente ao sítio alvo do DNA, que consiste de duas cópias da sequência: 5'--PuPuPuC(AT)(T/A)GPyPyPy-3', com o espaço entre os monômeros variando de 0 a 13 pares de base. Este sítio está bem degenerado; entretanto, os pares de base C:G e G:C na posição quatro e sete, respectivamente, são críticos para a ligação do *TP53* (EL-DEIRY *et al.*, 1992; FUNK *et al.*, 1992; ZAMBETTI *et al.*, 1992; FORD *et al.*, 1998).

Em células normais, os agentes que causam danos ao DNA induzem e ativam o *TP53* normal, o qual provoca a interrupção do ciclo celular em G1 ou apoptose (LEVINE, 1997). Acredita-se que a resposta do *TP53* ao dano no DNA seja necessária para prevenir a replicação e a segregação do DNA danificado, permitindo que a célula repare o DNA ou induza à morte celular. Esses processos são críticos para a manutenção da integridade e estabilidade do genoma, pois as células com *TP53* nulo são 1.000 vezes mais propensas à amplificação do gene do que as

células normais (LIVINGSTONE *et al.*, 1992; YIN; TAINSKY; SCHOFF, 1992). Finalmente, foi descoberto que este mutante R337H *TP53* perde a função em pH alcalino e temperaturas mais elevadas (DIGIAMMARINO *et al.*, 2002). Se a perda desta função ocorrer durante o período embrionário da adrenal, quando acontece intensa proliferação e morte celular programada, surge o TCA (FIGUEIREDO *et al.*, 2000). Isso explica o fato de o TCA ser diagnosticado mais frequentemente nos primeiros três anos de idade (MICHALKIEWICZ *et al.*, 1997).

A perda do controle do ciclo celular e o aumento da instabilidade genômica são características de todas as células tumorais. A ativação dos proto-oncogenes, (que promovem o crescimento celular) em associação com a inativação do gene supressor de tumor (que age para inibir a progressão do ciclo celular) contribuem, juntos, para a progressão do tumor. O supressor tumoral *TP53* tem um papel essencial no bloqueio do desenvolvimento do tumor e estudos epidemiológicos revelam que 50 a 60% de todos os cânceres têm um gene *TP53* mutado (LEVINE, 1997). Além disso, indivíduos que herdaram uma mutação germinativa no *TP53* são reconhecidamente mais predispostos a desenvolver tumores na infância (MALKIN *et al.*, 1990).

A inativação do *TP53* é a alteração genética mais detectada em cânceres humanos. Enquanto em outros países foram relatadas muitas alterações no gene *TP53* e também em outros genes (RODRIGUEZ-GALINDO *et al.*, 2005), no Paraná mais de 95% dos casos de TCA apresentam uma mutação idêntica do *TP53* em células germinativas (R337H). No entanto, avaliando-se o histórico de câncer nas famílias destas crianças, observou-se que elas não estão relacionadas com a SLF (RIBEIRO *et al.*, 2001; FIGUEIREDO *et al.*, 2006a).

A SLF é uma síndrome rara, na qual membros jovens de uma mesma família são suscetíveis a vários tipos de tumores, tais como sarcomas, câncer de mama, de cérebro, leucemia e TCA. Em famílias com SLF, os parentes de primeiro e segundo graus apresentam sarcomas, tumores cerebrais, câncer de mama, de pulmão, de fígado e outros tumores menos frequentes, incluindo o TCA (DONEHOWER *et al.*, 1992; LEVINE *et al.*, 1995; DESANDES *et al.*, 2004). Esta síndrome é causada principalmente pela mutação no fator de supressão tumoral - *TP53* (FUNK *et al.*, 1992; JACKS *et al.*, 1994; HOLLSTEIN *et al.*, 1996 ; FORD *et al.*, 1998) e, por esta razão, passou-se a investigar o *TP53* em crianças que desenvolveram TCA no Estado do Paraná, mesmo sabendo que não foi encontrado um aumento de

incidência de outros tipos de câncer em crianças portadoras da mutação R337H *TP53*. Nos tumores examinados nas crianças no Estado do Paraná, o alelo normal do *TP53* é deletado e expressa grandes quantidades de proteína p53 mutante em seu núcleo, indicando que este p53 é funcionalmente inativo *in vivo* (RIBEIRO *et al.*, 2001).

LI *et al.* (1988) caracterizaram a SLF conforme os seguintes critérios: um probando com sarcoma antes dos 45 anos de idade + um parente de primeiro grau com qualquer tipo de câncer antes dos 45 anos de idade + um outro parente de primeiro ou segundo grau com qualquer tipo de câncer antes dos 45 anos de idade ou um sarcoma em qualquer idade.

BIRCH *et al.* (1994b) descreveu critérios que não caracterizam a SLF clássica, mas que podem se tratar de Li-Fraumeni *símile* (LFS): probando com qualquer tipo de câncer pediátrico ou sarcoma, tumor cerebral ou TCA diagnosticado antes dos 45 anos de idade + um parente de primeiro ou segundo grau com um câncer característico da SLF (sarcoma, mama, cérebro, TCA ou leucemia) em qualquer idade + um parente de primeiro ou segundo grau com qualquer tipo de câncer diagnosticado antes dos 60 anos de idade.

Outra classificação estabelecida por CHOMPRET *et al.* (2001) pode desconsiderar o histórico familiar de câncer em casos específicos, a saber:

a) probando com um tumor característico da SLF (sarcoma, osteossarcoma, cérebro, câncer de mama na pré-menopausa, TCA, leucemia, câncer bronco-alveolar) antes dos 46 anos de idade + um parente de primeiro ou segundo grau com um tumor característico da SLF (com exceção de câncer de mama se o probando já apresentou este câncer) antes dos 56 anos de idade ou com múltiplos tumores; ou

b) probando com múltiplos tumores (exceto tumores de mama), sendo dois destes tumores característicos da SLF e o primeiro tumor tendo surgido antes dos 46 anos de idade; ou

c) paciente com TCA ou tumor de plexo coroide, independente do histórico familiar de câncer.

Famílias com alta incidência de câncer estão associadas a mutações em células germinativas no gene *TP53*. De fato, KLEIHUES *et al.* (1997) propuseram que o carcinoma de córtex adrenal na infância é “quase um diagnóstico de um alelo de *TP53* mutado que foi herdado”. Em conformidade com esta correlação, a

mutação R337H *TP53* (Arg para His no códon 337) foi encontrada na maioria das crianças com TCA no Estado do Paraná. Embora esta mutação não pareça predispor esses indivíduos a outras formas de câncer (por exemplo, osteossarcomas) os dados preliminares (baseados em famílias com pelo menos um caso de TCA em crianças, ou seja, em dados que não são da população geral) indicaram que aproximadamente 1 em cada 10 crianças (4 meninas para 1 menino) com esta mutação desenvolve o TCA (FIGUEIREDO *et al.*, 2006a), que é um fato verdadeiramente marcante quando se considera que a incidência mundial para câncer de adrenal é de 0,20 a 0,38 / milhão / ano em crianças com idade abaixo de 15 anos e que a frequência de carcinoma adrenal em pacientes portadores de SLF clássica é somente de 3,6% (KLEIHUES *et al.*, 1997). Por outro lado, a penetrância do alelo R337H no TCA é igual ou inferior à frequência para câncer em osso (13%), cérebro (12%) e tecidos moles (12%) observados em pacientes portadores de SLF (KLEIHUES *et al.*, 1997). Entretanto, a mutação R337H *TP53* na linhagem germinativa predispõe significativamente e mais seletivamente ao TCA em crianças. Estudos recentes revelaram também que outros fatores são importantes na formação do tumor, incluindo-se principalmente a expressão elevada do gene *IGF2* em todos os TCA (WEST *et al.*, 2007).

É marcante o fato de que quase todos os pacientes com TCA possuem a mesma mutação de ponto no *TP53*. Embora os pacientes não sejam parentes e venham de diferentes grupos étnicos, é teoricamente possível que a mutação tenha surgido de um ancestral comum, podendo representar um “efeito fundador” (PINTO *et al.*, 2004).

Uma característica deste gene supressor de tumor é que o alelo normal é deletado nas células tumorais. Isso se refere à perda de heterozigose (LOH) e é consistente com a perda de função do *TP53*. Para testar se a LOH ocorre em tumores de adrenal de pacientes com a mutação germinativa R337H, o DNA da célula tumoral de seis pacientes foi analisado para o sequenciamento completo do gene *TP53*. Neste estudo, o alelo mutado esteve presente em cinco tumores; o outro tumor manteve a heterozigose (RIBEIRO *et al.*, 2001), porém, uma possível explicação para este achado é que esta amostra poderia ter sido contaminada com tecido normal.

O teste de DNA realizado no sangue colhido do pezinho do RN é um método que combina PCR e digestão enzimática *Restriction Fragment Length Polymorphism*

(RFLP-PCR). A sequência do exon 10 é amplificada a partir do DNA do sangue periférico, digerido com endonuclease de restrição *HhaI* e analisada em eletroforese em gel de agarose. O exon 10 normal é clivado em dois fragmentos (154 e 293 pb), ao passo que a sequência do mutante R337H permanece intacta e produz um único fragmento de 447 pb. De acordo com a análise sequencial do DNA, esse ensaio demonstrou que a LOH ocorre em quase todos os casos (FIGUEIREDO *et al.*, 2005). A perda do alelo normal é comum no TCA e se trata de uma segunda etapa importante para a gênese tumoral e (ou) a progressão do tumor, conforme hipótese de KNUDSON (1971).

A meia-vida do p53 normal é muito pequena e a sua expressão em células normais ou tumorais com *TP53* normal é bem menor e abaixo dos níveis detectáveis por imunoistoquímica (IQ). Por outro lado, o R337H *TP53* mutante encontrado no Estado do Paraná tem, normalmente, uma meia vida longa e acumula-se no núcleo das células tumorais. Presume-se que isso aconteça devido a sua incapacidade funcional e, conseqüentemente, pode ser facilmente detectado por IQ usando-se anticorpos monoclonais. O tumor de córtex adrenal em paciente sem mutação no *TP53* não mostra acúmulo de p53 (proteína). Estes achados são consistentes com estudos prévios que descrevem *TP53* no núcleo de células de TCA que aparecem em pacientes com síndrome de Li-Fraumeni e que apresentam mutações de *TP53* (por exemplo, R248W), mas não em tumores com p53 normal (REINCKE *et al.*, 1994; EVANS; LOZANO, 1997). O elevado nível de proteína p53 em TCA indica que a proteína mutante p53-337H é funcionalmente inativa.

Noventa e sete por cento das crianças que desenvolveram o TCA no Estado do Paraná eram portadoras da mutação R337H *TP53* em linhagem germinativa (no exon 10, códon 337) (RIBEIRO *et al.*, 2001). Em uma avaliação de 30 famílias contendo 41 crianças que desenvolveram o TCA (1-5 casos/família), questionou-se quantos membros dessas famílias seriam portadores de R337H para se calcular a relação do “número de casos de TCA em crianças / número total de portadores da mutação R337H”, o que revelou que aproximadamente 90% de todos os portadores de R337H *TP53* não desenvolveriam o TCA, mas poderiam ter filhos ou netos com o TCA (FIGUEIREDO *et al.*, 2006a). Nota-se neste cálculo que o risco de desenvolvimento do TCA foi de 10% nos indivíduos portadores da mutação R337H, enquanto que o restante dos familiares foi poupado, provavelmente porque não apresentaram outras alterações consideradas importantes para o desenvolvimento

do TCA (FIGUEIREDO *et al.*, 2006a). Desta forma, seria inconcebível esperar que houvesse mais casos de TCA em todo o restante da família investigada, o que elevaria a penetrância para um valor acima de 10% (FIGUEIREDO *et al.*, 2006a). A melhor forma de se obter o valor correto da penetrância da mutação R337H para o TCA seria examinar uma população sem limitações de histórico de câncer de qualquer tipo, e que contemplasse a faixa etária de risco para o TCA, a saber, crianças de 0 a 5 anos de idade, como foi realizado neste rastreamento neonatal. Sem esses cuidados não seria correto tirar conclusões sobre a penetrância da mutação R337H para o TCA e sobre a vigilância epidemiológica para o diagnóstico precoce do TCA.

Estudos prévios reportaram mutações específicas detectadas em indivíduos de determinadas regiões do globo, como a mutação somática do códon 249 (arginina para serina) do gene *TP53*, comum em pacientes com carcinoma hepatocelular (CHC) de regiões geográficas distintas (sul da África e Qidong, China) e que é induzida pela exposição à aflatoxina B1 (WANG *et al.*, 1999; SOHN; JAITOVITCH-GROISMAN; BENLIMAME, 2000). A origem da mutação R337H é desconhecida, mas, como nos casos de CHC, hipotetizou-se que ela estava relacionada a um fator ambiental (produto químico). Independentemente de como esta mutação surgiu, acredita-se na sua origem a partir de um ancestral comum, ou seja, de um efeito fundador (PINTO *et al.*, 2004).

A perda do alelo normal nos casos de TCA e o acúmulo anormal de proteína p53-R337H no núcleo de células tumorais (um achado comum nos tumores associados a p53) estão de acordo com premissas de que esta mutação apresenta um papel importante no desenvolvimento de TCA. A penetrância de 10% da mutação R337H *TP53* para o TCA pode estar relacionada, em parte, à incapacidade do R337H de agir (FIGUEIREDO *et al.*, 2006a). Para satisfazer a hipótese de duas etapas / eventos de KNUDSON (1971), uma alteração adicional seria necessária, que é frequentemente manifestada pela deleção do alelo normal do *TP53*. Ainda seria preciso haver alcalinização intracelular e temperatura febril para ocorrer a perda de função da p53R337H (DIGIAMMARINO *et al.*, 2002). Embora a origem do TCA dependa fundamentalmente do alelo mutado R337H *TP53*, existe evidência da participação adicional de outros fatores, sugerindo que este processo de carcinogênese é multifatorial (FIGUEIREDO; PIANOVSKI; CUSTODIO, 2006b). Foi verificado que em aproximadamente 80% das crianças com a mutação R337H

poderia haver amplificação do gene do fator esteroideogênico-1 (*SF-1*) (FIGUEIREDO *et al.*, 1999; FIGUEIREDO *et al.*, 2005; PIANOVSKI *et al.*, 2006b), mas essa alteração estava associada com R337H em quase todos os casos de TCA investigados.

Na maioria das vezes, as mutações no gene *TP53* que dão origem a tumores, são mutações de ponto que ocorrem no domínio de ligação ao DNA e resultam em proteínas mutadas com alterações na sequência específica de ligação, transativação ou inibição de crescimento (YAN; CHEN, 2010). Outros mecanismos estão envolvidos na inativação destas proteínas mutadas, tais como: perda de fatores acima (*ATM*, *p14^{ARF}*) e de mediadores abaixo (*Caspase 9*, *APAF1*) da cascata do *p53* ou expressão aumentada de reguladores inibitórios (*Mdm2*, *Mdm4*, *Papiloma Vírus Humano E6*) (ZAMBETTI, 2007). A maioria das mutações no gene *TP53* ocorre em códons específicos no domínio de ligação ao DNA (175, 245, 248, 249, 273 e 282), mas mutações em outras regiões deste gene também são importantes e estão sendo cada vez mais estudadas (VARLEY *et al.*, 1999; RIBEIRO *et al.*, 2001).

O *TP53* é um gene autossômico que codifica um fator de supressão tumoral; sendo assim, acredita-se que somente com a perda somática do alelo normal poderá haver a perda da proteção antitumoral na célula afetada. Tal situação ocorre para a maioria das mutações no gene *TP53* em famílias com a SLF (VARLEY *et al.*, 1999), nas quais a grande parte dos indivíduos afetados geralmente morre de câncer antes de completar 80 anos de idade.

Alguns autores relataram que dímeros e tetrâmeros de *p53* podem ser inativos quando formados a partir de um alelo mutante e de um alelo selvagem, o que explica o efeito dominante-negativo exibido pelo alelo mutante na presença do alelo selvagem (MILNER; MEDCALF, 1991; DE VRIES *et al.*, 2002). Vários casos descritos de câncer em humanos comprovam a expressão do alelo mutante do *TP53* na presença do alelo selvagem (RUSSELL-SWETEK *et al.*, 2008). Da mesma forma, em alguns casos de tumores desenvolvidos por ratos heterozigotos para uma mutação dominante-negativa do *TP53* também foi possível verificar que não houve perda do alelo selvagem do *TP53* (LIU *et al.*, 2000).

No caso do alelo R337H *TP53*, que não tem alteração no domínio de ligação ao DNA (comum na maioria dos casos de SLF), a proteína codificada pode perder sua função de proteção em uma condição patológica adicional para a célula

que já perdeu o alelo normal. Essa condição pode se fazer presente quando o meio intracelular está alcalinizado e (ou) com temperatura febril (uma situação possível durante uma infecção, que é relativamente comum na vida intrauterina). O pH alcalino e o estado febril levam a um distúrbio no grau de protonação da histidina da proteína R337H (a histidina ocupa o lugar original da arginina devido à mutação de ponto CAC no lugar de CGC no códon 337), afetando consequentemente a ponte de sal com o aminoácido 352, promovendo uma instabilidade na formação de dímeros e tetrâmeros de p53 e, finalmente, perda de função (DIGIAMMARINO *et al.*; 2002) (FIGURA 1). O acúmulo de todas estas alterações não é algo tão fácil de acontecer. No entanto, avaliando-se as descobertas subsequentes sobre outras alterações moleculares que poderiam contribuir com a formação do TCA (FIGUEIREDO; PIANOVSKI; CUSTODIO, 2006b), pode-se sugerir a hipótese multifatorial para o surgimento deste tumor.

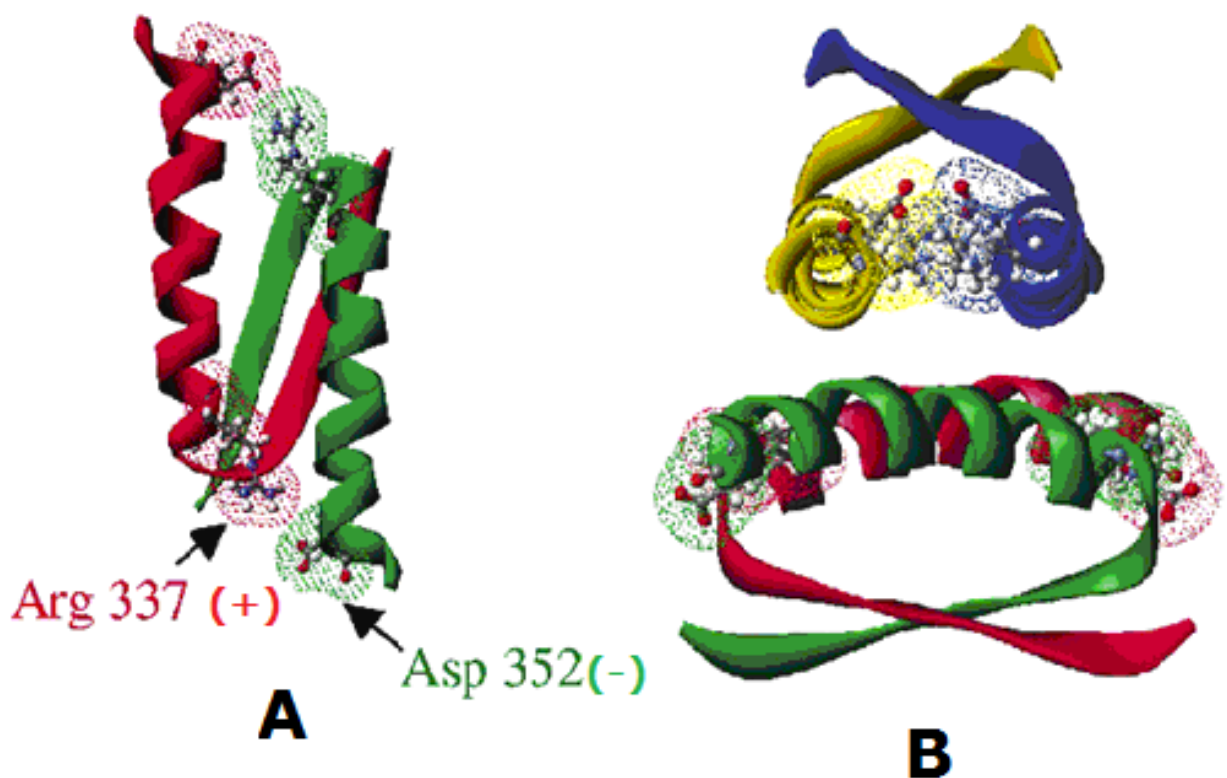


FIGURA 1 - TETRAMERIZAÇÃO DA PROTEÍNA p53 R337H

FONTE – Reproduzido de DIGIAMMARINO *et al.*, 2002.

NOTA - **A** - Estrutura tridimensional do dímero estável, com a formação da ponte de sal entre Arg337(+) e Asp352 (-). **B** – As pontes de sal que estabilizam a ligação entre os dímeros para a formação dos tetrâmeros.

Admite-se que no período entre a vida intrauterina e imediatamente após o parto, podem acontecer situações favoráveis à formação do TCA (além da mutação germinativa e da perda somática do alelo normal, alteração do pH e elevação de temperatura com perda de função do *TP53* durante a fase de morte celular programada da zona fetal, onde podem acontecer falhas) e a participação de outros fatores alterados, de maneira mais sensível para o córtex adrenal. Entretanto, existem evidências de outros tipos de tumores nos quais a LOH nem sempre acontece, podendo ocorrer também a perda do alelo R337H com permanência do alelo normal no tumor, como nos tumores cerebrais (CUSTODIO *et al.*, 2011a; SEIDINGER *et al.*, 2011), mama, estômago (FIGUEIREDO *et al.*, 2006a; ACHATZ *et al.*, 2007; ASSUMPÇÃO *et al.*, 2008) e osteossarcoma (SEIDINGER *et al.*, 2011).

A atenção primária sempre se concentrou nos tumores da população pediátrica, criando-se um viés de informação em relação à população adulta portadora da mutação R337H, com e sem TCA. Por outro lado, em pesquisas que estudam apenas SLF e LF-*símile* e avaliam preferencialmente os adultos e poucas crianças, notaram-se alguns adultos portadores da mutação R337H no *TP53* que desenvolveram tumores, incluindo-se aqueles com e sem LF-*símile* (ACHATZ *et al.*, 2007). A questão sobre o aparecimento de casos isolados de câncer em famílias que segregam a mutação R337H, permaneceu sem esclarecimentos. A solução para essa dúvida foi também, além do suporte à criança, desenvolver um estudo de base populacional para detectar o RN com a mutação e, a partir dele, investigar toda a família do lado que segrega a mutação, como mostrado no heredograma da FIGURA 2.

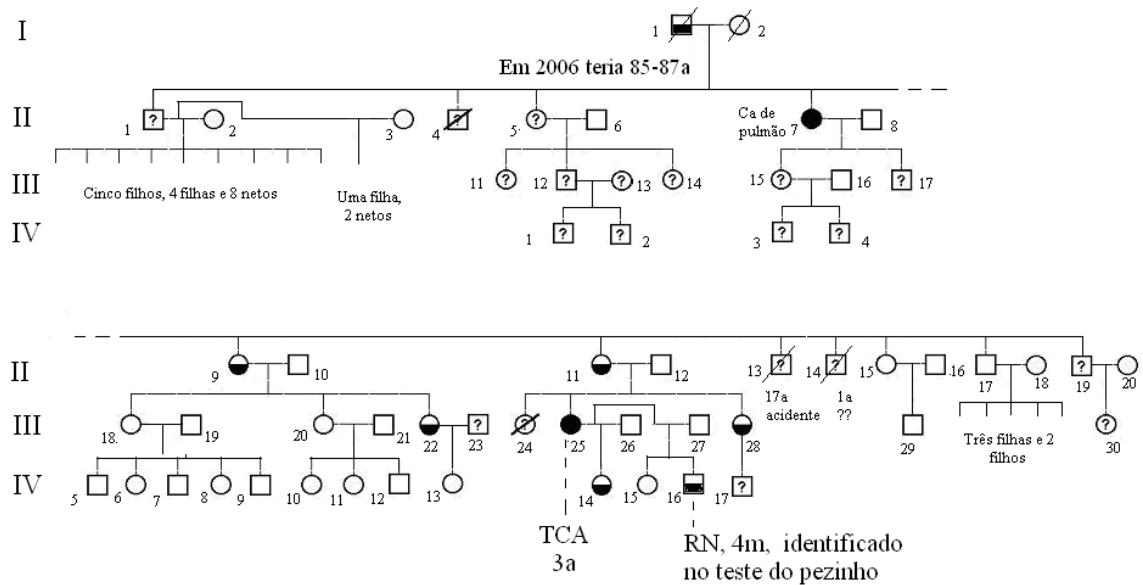


FIGURA 2 - HEREDOGRAMA DE UMA FAMÍLIA PORTADORA DA MUTAÇÃO R337H NO GENE *TP53*

FONTE – Dados desta pesquisa (2011).

A estimativa inicial para a prevalência da mutação R337H no gene *TP53* (1:1500 RN vivos) no Paraná foi baseada em observações limitadas a 30 famílias com 41 crianças com TCA e aproximadamente 410 indivíduos carreadores dessa mutação (FIGUEIREDO *et al.*, 2006a). O significado dessa elevada prevalência é preocupante porque indica a existência de um grande número de pessoas em risco de desenvolver algum tipo de câncer, e por se tratar de uma mutação germinativa, este número poderá aumentar nas próximas décadas. Em 2005 foi constatado em uma família paranaense que esta mutação já existia há pelo menos 110 anos (FIGUEIREDO *et al.*, 2006a). Entretanto, acredita-se que ela surgiu há muito mais tempo, sendo impraticável definir sua data da origem (efeito fundador) e, na ausência de casos de mutação “*de novo*”, avaliar se algum fator mutagênico de origem ambiental está a ela associado. Entretanto, para os indivíduos portadores da mutação, torna-se muito importante a investigação de fatores ambientais que podem influenciar em etapas adicionais (somáticas) em direção à formação do TCA ou de outros tumores em indivíduos que segregam a mutação germinativa R337H no *TP53*. Por esse motivo, outra linha de pesquisa, o projeto Geomedicina, procura investigar a importância das características do ambiente, a condição socioeconômica vigente e a morbi-mortalidade por câncer no Paraná (disponível em www.geomedicina.org.br, <http://geomedicina.pelepequenoprincipe.org.br>)

3.3 PERDA DE *IMPRINTING* DO *IGF-2*

Recentemente, descobriu-se que a segunda alteração molecular mais importante na formação do TCA em crianças do Estado do Paraná é a perda do *imprinting* do Fator de crescimento Insulina-símile 2 (*IGF-2*) (ROSATI *et al.*, 2008).

O *IGF-2* estimula a proliferação e a sobrevivência celular por meio da ativação do Receptor do fator 1 de Crescimento Insulina-símile (*IGF1R*) (DOGHMAN *et al.*, 2010). O gene *IGF-2*, localizado no cromossomo 11 (11p15.5), é sujeito a *imprinting*, ou seja, a expressão de *IGF-2* é controlada pelo alelo paterno, porém, em algumas condições, o alelo paterno não se expressa de forma normal na presença de igual quantidade de alelo(s) materno(s) (REIK *et al.*, 2000). Além disso, existe outra condição que não depende apenas do equilíbrio de cópias dos alelos paterno e materno, mas também do grau de metilação dos centros de *imprinting* próximos ao gene *IGF-2*. Estudos em modelos animais mostram que a expressão de *IGF-2* é elevada em tecidos fetais, mas a síntese é fortemente reduzida após o nascimento (LE ROITH; BUTLER, 1999). Em vários tipos de tumores pode-se encontrar uma expressão elevada de *IGF-2* (OGAWA *et al.*, 1993; WANG *et al.*, 1998), que pode ser causada por perda de *imprinting*, deleção total ou parcial do alelo materno ou ainda por isodissomia paterna: substituição do alelo materno por uma cópia do paterno (SUTTER; GRIMBERG, 2006). Outro estudo desenvolvido no Paraná analisou o perfil de expressão de *IGF2* em amostras de TCA de crianças portadoras da mutação R337H *TP53* e confirmou a elevada expressão de *IGF-2* e perda do *imprinting* nestes tumores (ROSATI *et al.*, 2008).

Com relevância para esta pesquisa, realizou-se o primeiro estudo que analisou o perfil de expressão dos genes, usando a técnica do microarranjo em tumores adrenocorticais de crianças. Tal abordagem confirmou a elevada expressão de *IGF-2* nestes tumores (WEST *et al.*, 2007).

3.4 CARCINOMA DE PLEXO COROIDE EM CRIANÇAS NO ESTADO DO PARANÁ

Um estudo recente encontrou evidências de aumento da incidência de casos de carcinomas de plexo coróide (CPC) no Estado do Paraná, baseado na

proporção deste tipo de câncer em relação ao esperado para todas as formas de câncer na população pediátrica (BLEGGI-TORRES *et al.*, 2004).

Os CPC são tumores originários do epitélio que reveste os ventrículos cerebrais e que tipicamente afetam crianças. Os CPC correspondem a 1-4% de todos os tumores pediátricos intracranianos (BERGER *et al.*, 1998) e são muito menos comuns que os papilomas intraventriculares (AGUZZI; BRANDNER; PAULUS, 2000). Os CPC são tumores muito agressivos, de prognóstico muito desfavorável e normalmente aparecem na primeira década de vida (38% dos casos) (MELO *et al.*, 2003). O número relativamente pequeno de casos de CPC na literatura e a falta de dados epidemiológicos relevantes sobre os aspectos clínicos e diagnóstico anatomopatológico, dificultam o estabelecimento de uma abordagem terapêutica padronizada no manejo desta doença (CHOW *et al.*, 1999; McMANAMY *et al.*, 2007). Considerando a alta mortalidade por CPC, é muito importante identificar marcadores biológicos que possam ser utilizados para entender a estratificação de risco, o mecanismo de formação do tumor e seu prognóstico (GESSI; GIANGASPERO; PIETSCH, 2003). O mecanismo mais comum envolvendo a formação do CPC está relacionado à disfunção da proteína p53 supressora tumoral, haja vista que o CPC tem sido mais frequentemente encontrado em famílias com a SLF (TABORI *et al.*, 2010).

Recentemente, foi reportado que 50% dos pacientes com CPC eram positivos para uma mutação germinativa no gene *TP53* (TABORI *et al.*, 2010). Os autores concluíram que crianças que desenvolveram CPC com baixa variação estrutural total e ausência de disfunção do *TP53*, têm um prognóstico favorável e podem ser tratadas com sucesso sem a utilização de radioterapia.

Vinte e quatro de 29 casos de CPC incluídos neste estudo (24/29, 82,7%) foram avaliadas previamente quanto à sua histopatologia, o que indicou um aumento na incidência de CPC no Estado do Paraná provavelmente devido a um patógeno desconhecido (BLEGGI-TORRES *et al.*, 2004). O CPC é tão raro quanto o TCA, e ambos ocorrem nos Estados Unidos em uma incidência de 0,3 / milhão de crianças abaixo de 15 anos de idade (PARKIN *et al.*, 1988; OGAWA *et al.*, 1993; AGUZZI; BRANDNER; PAULUS, 2000; WOLFF *et al.* 2002).

3.5 IMPACTOS SOCIAIS, ÉTICOS E ECONÔMICOS DO RASTREAMENTO NEONATAL

O TCA em crianças representa um problema de saúde pública no Estado do Paraná, onde a incidência é 15 vezes maior do que em qualquer outro local (PIANOVSKI *et al.*, 2006a), e ocorre principalmente em crianças menores de 5 anos. São esperados pelo menos 12 novos casos de TCA pediátricos por ano no Paraná, cuja taxa de sobrevivência global foi mostrada ser de apenas 54,2% (95 IC%, 48,2% para 60,2%), com base em uma revisão de 254 casos de crianças e adolescentes em que a maioria dos casos eram desse Estado (MICHALKIEWICZ *et al.*, 2004). A baixa taxa de sobrevivência é muitas vezes decorrente das condições de diagnóstico em estádios avançados (III e IV). A maioria desses pacientes teve várias recaídas que exigiram repetidos procedimentos cirúrgicos e, pelo menos, oito ciclos de quimioterapia, tratamento prolongado com mitotano (droga extremamente tóxica) e muitos dias de internação na unidade de cuidados intensivos após procedimentos cirúrgicos.

A triagem para fenilcetonúria também é uma questão de saúde pública e a pesquisa para este tipo de doença é obrigatória em RN da maioria dos países. A frequência média de fenilcetonúria no Sul do Brasil (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul) é de aproximadamente 1:30.000, correspondendo a um total de 12 novos casos em 2007 para todos os RN nestes três Estados, segundo os dados do Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN) de 2007 (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007). Avaliando-se esses dados, pode-se observar que o número de novos casos anuais de TCA em crianças é maior que o número de casos de fenilcetonúria no Paraná. Considerando-se a elevada taxa de mortalidade do TCA devido ao seu diagnóstico tardio (MICHALKIEWICZ *et al.*, 2004), a sua realidade no Paraná é tão ou mais grave do que a da fenilcetonúria nesse Estado. Assim, considerando o número total de crianças em risco de atingir estádios incuráveis de TCA e levando-se em conta o apoio adicional de uma equipe interdisciplinar para as famílias portadoras da mutação R337H *TP53* em risco de desenvolver TCA nos seus RN e outros tipos de câncer em adultos (especialmente câncer de mama ou de estômago), pode-se concluir que os benefícios do protocolo de vigilância ambulatorial superam seus custos finais. Uma alternativa para diminuir custos foi a adoção de um sistema de comunicação baseado na web (www.curadotca.org.br com

acesso ao VERTEX, sistema de telemedicina), o qual tem beneficiado a orientação a médicos do interior do Estado no acompanhamento de crianças portadoras da mutação R337H *TP53*. Essa estratégia tem possibilitado também o acesso a informações importantes (como resultados de exames e outras avaliações), que podem ser transmitidas por médicos treinados, de forma presencial, aos pais dos RN.

A justificativa para a implantação de um rastreamento neonatal de rotina para a mutação R337H *TP53*, seguido de um protocolo de vigilância ambulatorial para o diagnóstico precoce do TCA no Estado do Paraná, está baseada em quatro princípios do rastreamento populacional descrito pela Organização Mundial de Saúde (WILSON, JUNGNER, 1968; McCABE, McCABE, 2008), a saber:

a) a relevância de saúde pública da doença. No Estado do Paraná, a incidência do TCA pediátrico é aproximadamente 12 a 15 vezes maior do que em qualquer outra região do mundo (PIANOVSKI *et al.*, 2006a) e o tumor acomete principalmente crianças menores de 5 anos de idade. Dados do Registro Internacional de Tumor Adrenocortical Pediátrico indicam que a sobrevida global das crianças com esta doença é de apenas 54,2% (95% de intervalo de confiança, 48,2% a 60,2%)(MICHALKIEWICZ *et al.*, 2004). Pacientes com estadios avançados da doença, apresentando tumores que não permitem a ressecção completa, geralmente não são passíveis de sucesso no tratamento quimioterápico e têm taxas de sobrevida muito baixas. Em contrapartida, pacientes com diagnóstico do TCA em estadios iniciais apresentam uma excelente qualidade de vida após a completa ressecção do tumor. Portanto, o sucesso do tratamento depende da identificação das crianças com o TCA em estadios iniciais. O número de crianças com diagnóstico de TCA é muito maior do que o número total de casos / ano de fenilcetonúria no Brasil (1:25.000). Os resultados divulgados pelo Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN) em 2007 (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007), mostram que a região Sul do Brasil apresentou um número total de 12 casos de fenilcetonúria (6 no Paraná, 6 no Rio Grande do Sul e nenhum em Santa Catarina), o que é aproximadamente igual ou inferior ao número total de casos de TCA por ano no Paraná. Esta diferença é bastante relevante na tomada de decisão sobre o diagnóstico precoce do TCA, cuja mortalidade atual é de aproximadamente 50%. Da mesma forma, O PNTN revelou 23 casos de fibrose cística para os 3 Estados da região do Brasil;

b) a disponibilidade de um teste de triagem validado. O rastreamento genômico, utilizando amostras de sangue periférico coletado do pezinho dos RN, foi validado a partir de vários experimentos preliminares. O teste de PCR-RFLP, que analisa amostras de sangue de RN diferentes (*pool*), é altamente específico e sensível e foi otimizado para permitir um número máximo de amostras analisadas simultaneamente, sem comprometer a qualidade e a confiabilidade dos resultados obtidos (CUSTÓDIO *et al.*, 2011). O custo e o tempo destinados ao teste atual do pezinho para a triagem da fibrose cística (FC) são maiores do que para a pesquisa da mutação R337H *TP53* utilizado no presente trabalho; vale ressaltar o grande número de resultados falso-positivos encontrados no teste de triagem para a FC, cujo diagnóstico é sugerido pela elevação na concentração de tripsinogênio imunoreativo (IRT). Do total de 456.982 RN nascidos entre agosto de 2001 e abril de 2004, 4.028 RN (0,9%) apresentaram um resultado de IRT “positivo” no primeiro exame. Estes RN foram convocados para uma nova avaliação, porém somente 3.815 compareceram para a realização do segundo exame, o qual identificou 478 (12,5%) RN com resultado de IRT “positivo” (87,5% de falso-positivos na primeira avaliação). A determinação quantitativa de eletrólitos no suor confirmou o diagnóstico de FC em 48 RN (0,01% do total), gerando uma média de 18 casos / ano de FC no Paraná (SANTOS *et al.*, 2005), semelhante ao número de casos de TCA. Portanto, é notável a diferença de custo e tempo em relação ao teste de triagem neonatal por meio de um ensaio de PCR-RFLP para a triagem do TCA no Paraná, sem considerar o fato de que o diagnóstico precoce do TCA oferece mais de 90% de chance de cura.

c) a comprovação de que as consequências da doença podem ser prevenidas através da detecção precoce. Dados do Registro Internacional de Tumor Adrenocortical Pediátrico de vários países demonstram que as crianças com diagnóstico de TCA em estádios iniciais têm um excelente prognóstico (a taxa de cura é superior a 90% após a ressecção do tumor no estágio I), enquanto que aquelas com a doença diagnosticada em estádios avançados têm um prognóstico muito pior (MICHALKIEWICZ *et al.*, 2004);

d) o financiamento do sistema público de saúde para o Programa de Triagem Neonatal. Os custos estimados da triagem neonatal para a mutação R337H *TP53* e do protocolo de vigilância ambulatorial incluem a contratação de profissionais treinados, suprimentos, infraestrutura laboratorial, equipamentos analíticos, controle

de qualidade e manutenções em geral tais como telefone, água, energia elétrica, segurança predial. Em adição, também são necessários investimentos para atividades de monitoramento dos indivíduos portadores da mutação, tais como localização das famílias, fornecimento de informações, aconselhamento genético, interpretação dos resultados dos exames, relatórios e gerenciamento dos casos diagnosticados. De acordo com o protocolo de vigilância ambulatorial, entre o nascimento e os 14 anos e 11 meses de idade, cada criança portadora da mutação R337H necessitará de 28 consultas médicas, 28 dosagens plasmáticas de sulfato de dehidroepiandrosterona (SDHEA) e 22 exames de ultrassonografia abdominal, ou seja, uma média de 1,87 consultas médicas, 1,87 dosagens de SDHEA e 1,44 exames de ultrassonografia abdominal por ano. O custo total do protocolo de vigilância ambulatorial proposto neste trabalho foi de, aproximadamente, R\$ 1.100.000,00 para os 5 primeiros anos de acompanhamento. Nesse custo estão incluídas a realização dos testes de identificação da mutação R337H para todos os membros da família e a vigilância ambulatorial para todas as crianças abaixo de 15 anos de idade, portadoras da mutação.

O custo deste projeto de rastreamento neonatal da mutação R337H *TP53* e de vigilância ambulatorial para o diagnóstico precoce do TCA foi calculado levando-se em conta a estrutura de uma instituição acadêmica, o Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe (IPPPP). No entanto, este valor deve ser, no mínimo, 3 vezes maior se a continuidade destes projetos for assumida por uma instituição não acadêmica, como, por exemplo, a Fundação Ecumênica de Proteção ao Excepcional (FEPE), a qual é a responsável pela realização dos testes do PNTN e acompanhamento das crianças identificadas com alterações no Estado do Paraná.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 POPULAÇÃO DE ESTUDO

A população da pesquisa corresponde aos RN portadores da mutação R337H *TP53* identificados a partir da triagem neonatal iniciada em dezembro/2005. As 397 maternidades do Estado do Paraná foram convidadas a participar deste projeto e receberam treinamento e material para a coleta de sangue do pezinho dos RN, utilizando papel de filtro (Cartão DNA, MGM Assessoria Biológica). O teste foi realizado gratuitamente para todos os RN do Estado do Paraná, a partir da assinatura da mãe no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), durante o período de dezembro/2005 até novembro/2010.

Após a confirmação do resultado positivo para a mutação, por meio da realização do teste de DNA em segunda amostra coletada do RN e em amostras de sangue coletada dos pais, todos os indivíduos do lado da família que segrega a mutação foram convidados a realizar o teste gratuitamente, com maior prioridade para a identificação de crianças menores de 15 anos portadoras da mutação.

A escolha pela população de RN do Estado do Paraná para este estudo teve como objetivo possibilitar o diagnóstico precoce do TCA pediátrico, haja vista que a presença da mutação R337H *TP53* é a principal causa do aparecimento deste tumor em crianças do nosso Estado.

4.2 COLETA DA AMOSTRA DE SANGUE PARA A PESQUISA DA MUTAÇÃO R337H

O material utilizado para a realização do exame de DNA, que identifica a mutação R337H *TP53*, foi o sangue periférico coletado do pezinho dos RN, simultaneamente à coleta de sangue para o teste do pezinho da FEPE, órgão responsável pela realização dos testes do PNTN em todo o Estado do Paraná. A coleta de sangue para os testes realizados pela FEPE é obrigatória para todos os RN, sendo normalmente realizada na maternidade imediatamente antes da alta do RN. A escolha para a coleta do sangue do pezinho dos RN, juntamente com a coleta para a FEPE, teve como objetivo evitar o desconforto de outra punção do RN e, desta forma, minimizar o estresse provocado a eles.

O sangue foi armazenado no cartão MGM, mantido em temperatura ambiente e encaminhado por SEDEX para o IPPPP ou para o CEGEMPAC (Centro de Genética Molecular e Pesquisa de Câncer em Crianças) em Curitiba.

Para a realização do teste em familiares de um RN positivo para a mutação, foi utilizado o sangue periférico coletado do pezinho de todos os parentes menores de 3 anos de idade. Para os parentes acima de 3 anos de idade foi utilizado o sangue periférico coletado de polpa digital.

Para análises moleculares de tumores diagnosticados neste estudo ou de outros tumores avaliados, foi utilizado o DNA extraído de blocos de parafina contendo o tecido tumoral (CUSTODIO *et al.*, 2011a).

4.3 IMPLANTAÇÃO DO PROJETO

A partir de dezembro de 2005, tendo como ponto de partida a Regional de Curitiba e Região Metropolitana (RM), iniciou-se a triagem neonatal para a identificação da mutação R337H *TP53*, visando ao diagnóstico precoce do TCA em crianças nascidas em todos os municípios do Paraná. Uma entrevista coletiva marcou oficialmente o início do projeto, com a divulgação de sua importância sob o ponto de vista de contribuição social, científica e econômica, além da necessidade da participação de todas as maternidades e hospitais do Estado (públicos e privados).

Na implantação deste projeto, a estratégia inicial foi realizar o teste primeiramente em RN de hospitais e maternidades de Curitiba e RM, utilizando-se esta experiência piloto para otimizar a implantação posterior do projeto em outras regiões do Estado.

Estudantes, profissionais, voluntários e o coordenador geral do projeto, Dr. Bonald Cavalcante de Figueiredo, assumiram o preparo dos TCLE contendo a membrana MGM para a coleta do sangue dos RN, a distribuição deste material para os hospitais e maternidades, bem como o treinamento das equipes de enfermagem para os cuidados na coleta do sangue do pezinho dos RN. Outros procedimentos realizados por esta equipe incluíram o esclarecimento de dúvidas de profissionais de saúde, por telefone e email, o recolhimento dos TCLE contendo o sangue dos RN, o envio do material aos laboratórios que centralizaram a realização do teste em Curitiba, a digitação de todas as informações de identificação do RN contidas no

TCLE (em software desenvolvido exclusivamente para o gerenciamento de informações deste projeto), a realização dos ensaios para a identificação da mutação R337H *TP53* nas amostras coletadas de RN e a divulgação dos resultados.

A equipe da pesquisa ministrou palestras nas 22 regionais de saúde do Estado do Paraná, visando instruir médicos e profissionais das maternidades participantes. O TCA é uma doença hereditária, cujo prognóstico pode ser otimizado através do aconselhamento genético e de exames gratuitos para o rastreamento da mutação nos RN e familiares abaixo de 15 anos de idade, ao contrário das doenças hereditárias do tradicional Teste do Pezinho da FEPE, para as quais o rastreamento genômico não é financeiramente viável devido ao grande número de diferentes mutações encontradas nos portadores destas doenças. A análise do DNA dos indivíduos identificados com alterações no PNTN pode ser útil para o aconselhamento genético destas crianças, assim como de seus pais e demais parentes portadores de mutações, haja vista que os portadores de alelos mutados não apresentam manifestações fenotípicas e muitas vezes desconhecem esta situação. Desta forma, a identificação da mutação R337H no gene *TP53* em RN do Estado do Paraná é mais fácil e tem um custo mais baixo quando comparada com as demais doenças investigadas no teste do pezinho da FEPE.

A coleta de material dos RN foi realizada em Curitiba e RM (Regional de Saúde número 02) por um período de 20 meses. A partir do conhecimento e controle do processo completo nesta Regional (utilizada como projeto piloto), o recrutamento das maternidades em outras localidades do Estado aconteceu de forma escalonada, incorporando aproximadamente 10% de novas maternidades a cada 2-3 meses, totalizando cinco etapas de implantação:

- Etapa 1: Regional 2 (Curitiba e RM) e Regional 1 (Paranaguá);
- Etapa 2: Regional 3 (Ponta Grossa), Regional 4 (Irati), Regional 6 (União da Vitória) e Regional 19 (Jacarezinho);
- Etapa 3: Regional 5 (Guarapuava), Regional 7 (Pato Branco), Regional 9 (Foz do Iguaçu), Regional 17 (Londrina), Regional 18 (Cornélio Procópio) e Regional 21 (Telêmaco Borba);
- Etapa 4: Regional 12 (Umuarama), Regional 14 (Paranavaí), Regional 15 (Maringá), Regional 16 (Apucarana), Regional 20 (Toledo) e Regional 22 (Ivaiporã);
- Etapa 5: Regional 8 (Francisco Beltrão), Regional 10 (Cascavel), Regional 11 (Campo Mourão) e Regional 13 (Cianorte).

O objetivo da investigação consistiu em realizar o teste em RN durante um período mínimo de 12 meses e um período máximo de 18 meses em cada maternidade do interior do Estado. As últimas maternidades onde o teste foi implantado estão localizadas nas Regionais de Saúde Francisco Beltrão, Campo Mourão, Cianorte e Cascavel, que aconteceu no mês de setembro de 2009, completando a etapa 5 do projeto (FIGURA 3). Portanto, as últimas amostras coletadas de RN em maternidades destas Regionais de Saúde foram recebidas até o mês de setembro de 2010 e, dessa forma, o projeto foi encerrado com 100% de abrangência do Estado do Paraná, conforme ilustrado na FIGURA 3.

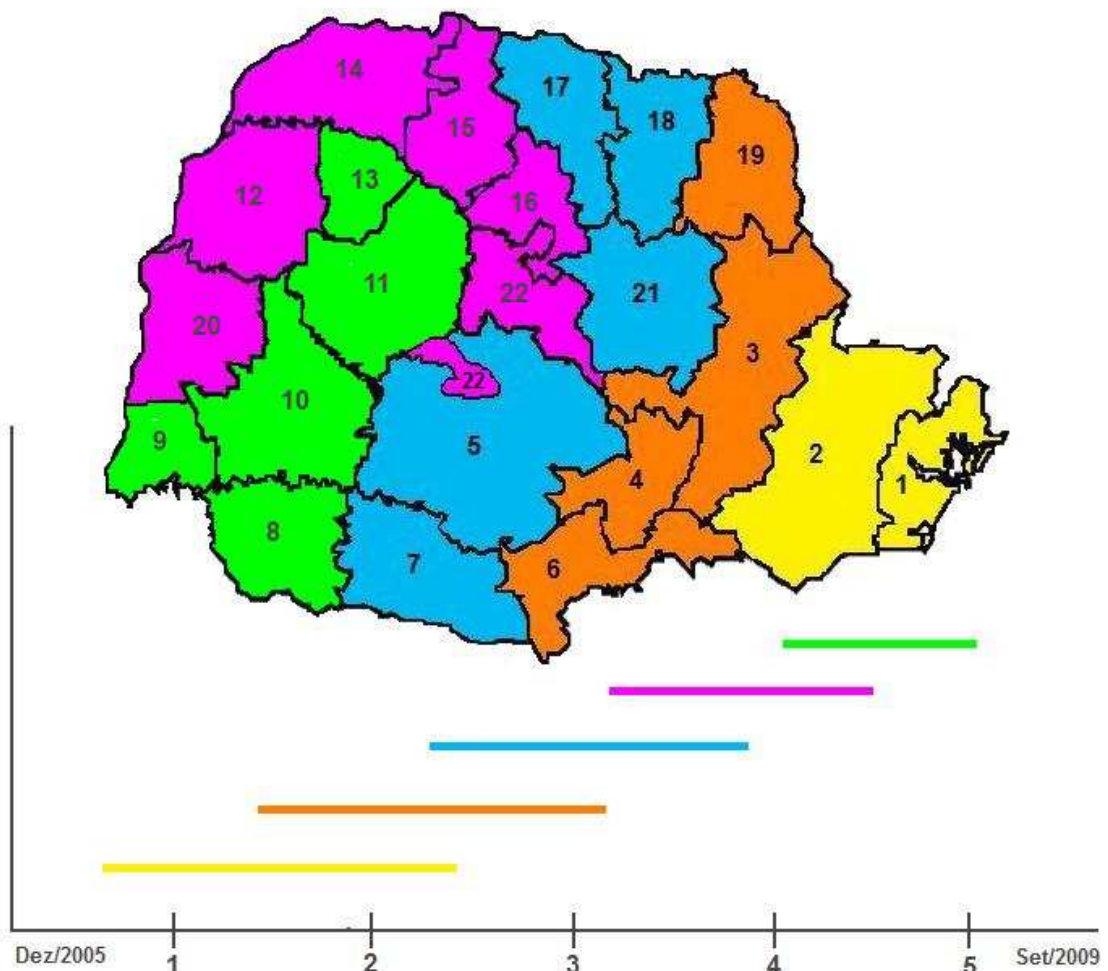


FIGURA 3 – IMPLANTAÇÃO ESCALONADA DO PROJETO NAS 22 REGIONAIS DE SAÚDE DO PARANÁ
 FONTE – A autora (2011)

Uma estratégia de implantação do projeto à distância foi utilizada quando houve impossibilidade da presença de um membro do projeto para a reunião de apresentação para as equipes das maternidades ou quando houve dificuldade de se

congregar grupos de várias maternidades da mesma regional de saúde para uma reunião central de apresentação do projeto. Nesses casos, a implantação à distância foi realizada com a seguinte conduta:

- contato por telefone com a Direção Clínica da Instituição para apresentação do projeto e sua aprovação verbal para a participação;
- envio por SEDEX de material explicativo e material de coleta das amostras, com orientações por escrito sobre o procedimento de coleta e armazenamento do material coletado até a data de envio das amostras para Curitiba;
- novo contato por telefone para esclarecimentos de eventuais dúvidas com a equipe de enfermagem;
- controle individual de cada maternidade / hospital para a data de postagem das amostras já coletadas e envio para Curitiba.

4.4 ENVIO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE EM CURITIBA

As amostras coletadas dos RN juntamente com os TCLE autorizando a realização do teste, foram encaminhadas para Curitiba via SEDEX, em datas pré-programadas. O controle das datas de postagem dos TCLE contendo o sangue coletado dos RN foi realizado segundo o número médio de RN / maternidade / mês (dados obtidos da SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DO GOVERNO DO PARANÁ, 2009) para não exceder o peso máximo permitido pelos correios para o envio do material. O custo de postagem deste material foi totalmente assumido pelo projeto e cada maternidade recebeu o envelope padrão fornecido pelo correio para possibilitar o envio do material coletado, sem ônus para a Instituição.

Os envelopes foram recebidos em Curitiba no endereço do Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe ou no CEGEMPAC, onde os testes de DNA foram realizados.

4.5 TERMOS DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Este estudo e seus TCLE foram avaliados pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR) (ANEXO 1) e também, pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP - processo nº 25000.056983/2005-82 de 06/09/2005 (ANEXO 2). Depois de identificada a necessidade de avaliar outros tipos de alterações moleculares em outros tumores encontrados em familiares portadores da mutação R337H no gene *TP53*, outro estudo com o mesmo nome foi ressubmetido e aprovado com novos objetivos pelo CEP do Hospital Pequeno Príncipe (HPP) (ANEXO 3) e CONEP processo nº 25000.164047/2008-97 de 28/09/2009 (ANEXO 4).

4.5.1 Consentimento para Teste no Sangue do RN

O TCLE foi utilizado para autorizar o estudo da mutação no sangue do RN (com o nome de “Teste de DNA para recém-nascido que pode prever o aparecimento de um tipo de câncer comum em crianças do Paraná”). Neste TCLE foi fixada uma membrana (cartão DNA da MGM, Assessoria Biológica, Curitiba) para coletar 1 gota de sangue do pezinho do RN visando sua utilização na pesquisa da mutação R337H *TP53*. No texto explicativo deste TCLE (ANEXO 5) é informado para a mãe que há uma probabilidade muito pequena de se obter um resultado falso-positivo para o teste de DNA, mas que existe um teste confirmatório que reduz totalmente este risco. Explica-se que existe uma pequena possibilidade de resultado falso-negativo, como pode acontecer em qualquer teste biológico. Este TCLE era assinado pela mãe (ou responsável) na maternidade.

4.5.2 Consentimento para Acompanhamento do RN pelo Médico Indicado

Os TCLE eram assinados pela mãe (ou responsável) a partir do conhecimento do resultado positivo da mutação no RN, ou seja, no momento do primeiro contato com a equipe deste projeto. Este TCLE era assinado com o objetivo de autorizar o acompanhamento do RN por um médico pediatra indicado pela equipe deste estudo. A mãe foi informada que poderia escolher outro médico pediatra para acompanhar seu RN. Qualquer que fosse a opção da mãe (ou responsável), a

equipe ofereceu todo o suporte necessário a partir da assinatura do TCLE autorizando o acompanhamento do RN (ANEXO 6).

4.5.3 Consentimento para Teste em Parentes Menores de 15 anos de um RN com a Mutação R337H *TP53* Confirmada

O TCLE, para esta finalidade, era assinado por um dos pais para permitir a realização do teste de DNA em parentes abaixo de 15 anos de idade (ANEXO 7).

4.5.4 Consentimento para Teste em Parentes de 15 a 18 anos de um RN com a Mutação R337H *TP53* Confirmada

O TCLE também era assinado, por um dos pais ou guardião, para autorizar a realização do teste de DNA para a pesquisa da mutação R337H *TP53* (ANEXO 8), porém a decisão de fazer ou não o teste de DNA coube ao adolescente.

4.5.5 Consentimento para Teste em Parentes Maiores de 18 Anos de um RN com a Mutação R337H *TP53* Confirmada

O TCLE era assinado por um parente adulto, autorizando a realização do teste de DNA para a pesquisa da mutação R337H *TP53* (ANEXO 9).

4.5.6 Consentimento para Análise de Perda de Heterozigose (LOH) em Crianças

O TCLE que autoriza a análise da LOH (*TP53*) em amostras de TCA de crianças (ANEXO 10), era assinado pelos pais ou responsável.

4.5.7 Consentimento para Análise de Perda de Heterozigose (LOH) em Adultos

O TCLE que autoriza a análise da LOH (*TP53*) em amostras de TCA de adultos (ANEXO 11) era assinado pelo próprio sujeito investigado.

4.5.8 Consentimento para Análise de Perda de Heterozigose (LOH) em Crianças Diagnosticadas com Outros Tipos de Tumores

O TCLE que autoriza a análise de LOH em crianças portadoras da mutação R337H, mas que foram diagnosticadas com outros tipos de tumores diferentes do TCA como, por exemplo, o CPC (ANEXO 12), era assinando pelos pais ou responsável.

4.6 ANÁLISE DO DNA E ACOMPANHAMENTO DOS RN COM RESULTADO POSITIVO PARA A MUTAÇÃO

Uma gota de sangue do pezinho do RN foi coletada na maternidade e analisada em papel de filtro especial fixado no TCLE. Quando a mutação R337H *TP53* foi detectada em um RN, membros de uma equipe multidisciplinar (médicos, psicólogos e assistentes sociais) entravam imediatamente em contato com a mãe da criança para uma consulta médica, com a finalidade de orientar e solicitar uma nova coleta de sangue do RN, juntamente com a primeira coleta de sangue da polpa digital dos pais, para fins de confirmação do resultado positivo para a mutação. A partir de um resultado confirmatório para a presença da mutação R337H *TP53*, a família passava a ter suporte da equipe multidisciplinar para aconselhamento genético, acompanhamento com o pediatra indicado para examinar regularmente o RN e para os exames de laboratório e ecografias. Todos os indivíduos do lado da família que segrega a mutação foram convidados a realizar o teste gratuitamente, com prioridade maior para as crianças abaixo de 15 anos de idade. Da mesma forma como os RN, todas as crianças abaixo de 15 anos (parentes do RN), portadoras da mutação R337H *TP53*, também receberam acompanhamento médico, exames laboratoriais e ecografia, gratuitamente. Os parentes adultos do RN, portadores da mutação R337H *TP53*, receberam aconselhamento genético e foram instruídos quanto ao risco de aparecimento de outros tipos de câncer, tais como mama e estômago.

As informações clínicas e as identidades das crianças e parentes portadores da mutação foram codificadas e somente a equipe multidisciplinar teve acesso aos dados.

4.7 PROTOCOLOS PARA ANÁLISE DO DNA

4.7.1 Preparação das Amostras para a Detecção da Mutação R337H *TP53* em Sangue Periférico

Experimentos-piloto realizados antes do início do projeto de pesquisa tiveram como objetivo definir as condições ideais do ensaio para a detecção da mutação R337H *TP53* em sangue de RN coletado em membrana MGM.

Os primeiros experimentos tiveram como objetivo definir a quantidade ideal de discos a serem utilizados nos ensaios, sem que houvesse interferência na sensibilidade e qualidade dos resultados. As membranas contendo o sangue dos RN foram picotadas para a obtenção de discos de 2mm de diâmetro, utilizando-se picotador Harris *Micropunch* (Harris). O ensaio foi realizado em microplacas de PCR onde foram testados de 1 até 11 discos / poço / reação, incluindo amostras positivas para a mutação R337H *TP53* em heterozigose (Controle Positivo), amostras negativas para a mutação (Controle Normal contendo somente o alelo selvagem do *TP53*) e o Controle Negativo da PCR (água ultrapura). Os experimentos-piloto mostraram que a quantidade mínima de discos por reação para produzir um amplificado contendo DNA suficiente para a visualização do resultado era de 1 disco de 2mm para cada paciente. No entanto, por questões de segurança (em caso de perda deste disco na lavagem), foi padronizado que a quantidade mínima ideal de amostragem a ser utilizada nos ensaios seria de dois discos de 2mm para cada paciente.

Na etapa seguinte dos experimentos-piloto, foram realizados testes para definir as condições ideais de um ensaio utilizando um *pool* de amostras de RN a serem analisadas simultaneamente, com o objetivo de detectar a mutação R337H *TP53* em ensaios de triagem. Foram realizados vários ensaios de PCR a partir de um *pool* de duas amostras até um *pool* de cinco amostras de RN diferentes, sendo que o padrão considerado ideal e seguro para a detecção da mutação foi o *pool* de três amostras, totalizando seis discos / poço (dois discos de três RN diferentes, analisados simultaneamente), que foi utilizado em todos os ensaios de triagem. Durante esse experimento-piloto foram utilizados os controles Negativo, Positivo e Normal, conforme descrito anteriormente, sendo o controle Positivo constituído por quatro discos de amostras sem a mutação + dois discos de amostras com a

mutação e o controle Normal constituído por seis discos de amostras sem a mutação.

Em mais de 1.000 ensaios experimentais realizados com amostras reconhecidamente positivas ou negativas para a mutação R337H *TP53*, foi possível identificar as amostras positivas para a mutação em 100% dos ensaios realizados em forma de *pool* de três amostras de RN analisadas simultaneamente. O ensaio em forma de *pool* foi validado com o objetivo de diminuir custos do projeto e otimizar o tempo de análise das amostras em ensaios de triagem. O ensaio em *pool* de três amostras foi utilizado para a detecção da mutação nas primeiras 135.000 amostras provenientes de maternidades do Estado do Paraná. No entanto, a partir de um resultado Positivo para a mutação R337H *TP53* nos ensaios em forma de *pool* de três amostras, um segundo ensaio individual foi realizado para fins de confirmação de resultado, utilizando dois discos de cada uma das 3 amostras de RN, analisadas separadamente. Os ensaios individuais foram utilizados também para a repetição de resultados duvidosos ou quando os discos de sangue (muito secos ou hemolisados) não permitiam a eliminação da hemoglobina com a solução de lavagem (MGM *plus*). O total de amostras analisadas mediante o ensaio individual foi de 39.261, totalizando as 174.261 amostras analisadas neste estudo.

Após a coleta do sangue do RN nas maternidades, os TCLE foram enviados para os laboratórios que centralizaram as análises em Curitiba. O tempo decorrido entre a coleta e o recebimento das amostras em Curitiba variou de 20 a 30 dias. Após a picotagem das amostras em placas de PCR, os discos passavam por um processo de lavagem utilizando-se 180µL de solução de MGM *plus* (MGM) durante 30 minutos a 37°C; quando necessário, uma segunda incubação foi realizada com a mesma solução pelo tempo necessário até o clareamento dos discos. Em aproximadamente 5 a 7% das amostras foi necessária uma terceira incubação com a solução MGM *plus* acrescida de proteinase K (20ng/µL), para a total eliminação da hemoglobina e clareamento dos discos.

Após o clareamento com uma, duas ou três incubações com a solução de lavagem, os discos passaram por uma lavagem final com água ultrapura em temperatura ambiente por 5 minutos. Após a eliminação total da água, os discos foram levados para a secagem em estufa a 60°C por 30 minutos, seguindo-se o armazenamento em *freezer* a -20°C por até três semanas antes da realização da PCR, sem comprometer a amplificação do DNA.

Na amplificação do DNA em ensaio com amostragem de dois discos de sangue foram utilizados os seguintes reagentes: Tampão PCR 10x (25µL), Taq polimerase regular Invitrogen ou Biotool (0,3 a 0,5UI), *primers Forward* e *Reverse* Invitrogen (100pmol), dNTP Invitrogen ou GE (25 nmol de cada) e MgCl₂ (50mM). O volume total de reação para um ensaio individual foi de 25µL e para um ensaio em *pool* de três amostras foi de 75µL. O produto de PCR corresponde a um fragmento de 447 pb do exon 10 do gene *TP53* obtido a partir dos seguintes *primers*: 59-CTG AGG CAC AAG AAT CAC-39 (*forward*) e 59-TCC TAT GGC TTT CCA ACC-39 (*reverse*), conforme descrito previamente [PIOVEZAN, G.C. **Prevalência do alelo TP53 R337H no Estado do Paraná**. 107 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.]. A amplificação do DNA genômico por PCR seguiu uma programação padrão, conforme descrito no QUADRO 1.

Etapas do ciclo	Temperatura	Tempo
Desnaturação das amostras	95° C	4 min
30 ciclos compreendendo:		
- desnaturação	95 ° C	45 s
- anelamento dos iniciadores	62 ° C	45 s
- extensão	72 ° C	45 s
Extensão final	72 ° C	10 min
Finalização	4 ° C	

QUADRO 1 - PROTOCOLO DE AMPLIFICAÇÃO DO DNA GENÔMICO POR PCR
 FONTE : A autora (2011)

Nas situações em que as três lavagens foram necessárias para a eliminação da hemoglobina dos discos ou quando havia escassez de amostra para a amplificação, utilizou-se Taq polimerase *Platinum* (Invitrogen) para aumentar a amplificação do DNA. O amplificado obtido foi armazenado a -20°C, *overnight*, ou submetido à digestão enzimática imediatamente.

Na digestão enzimática, 20µL do amplificado obtido na PCR foi incubado com enzima *HhaI* (Invitrogen e New England), a qual é capaz de clivar o fragmento de 447 pb em dois fragmentos de 154 e 293 pb na ausência da mutação R337H *TP53*. Na presença da mutação, o sítio de restrição da enzima *HhaI* é perdido e o fragmento de 447 pb não é clivado. Ensaio preliminares foram realizados com o objetivo de padronizar a quantidade mínima da enzima *HhaI* capaz de digerir o DNA

presente em 20µL do amplificado. Foram testadas diferentes quantidades de *HhaI*, de 0,1U até 20U e os experimentos-piloto mostraram que 0,5U da enzima de restrição era capaz de clivar todo o DNA. No entanto, por medida de segurança, o protocolo validado utilizava o dobro desta quantidade, ou seja, 1U de *HhaI*, a fim de eliminar o risco de digestão incompleta do DNA obtido no amplificado de PCR. Após a restrição enzimática, 20µL de cada amostra e 5µL de *loading buffer* foram aplicados em gel de agarose a 1,8% contendo brometo de *etidium* e submetidos a eletroforese por 1 hora a 200V. A presença de duas ou três bandas na eletroforese era indicativo da ausência ou da presença da mutação R337H *TP53*, respectivamente. Amostras positivas para a mutação foram submetidas ao sequenciamento do exon 10 do gene *TP53* para confirmação do resultado.

4.7.2 Detecção da Mutação R337H *TP53* em Amostras de CPC

Para a detecção da mutação R337H *TP53* em amostras de CPC, foram utilizados blocos de parafina contendo tecido tumoral. A extração do DNA foi realizada segundo o protocolo modificado de FARRUGIA; KEYSER; LUDS (2010).

Foram utilizadas amostras de tecido tumoral a partir de cortes de blocos de parafina em fragmentos de 5µM, eliminando-se as áreas visíveis de necrose tecidual. Os fragmentos foram colocados em tubos tipo *ependorf* com capacidade para 1,5mL. Em cada tubo foi adicionado 1 mL de água ultrapura (bidestilada e autoclavada) e os tubos foram levados para aquecimento em termobloco a 70°C por 20 minutos, seguindo-se de uma ultracentrifugação a 12.000g por 10 segundos e eliminação do líquido contendo a parafina derretida. Este procedimento foi repetido por três vezes. Na quarta repetição, os tubos receberam 1mL de água ultrapura e foram incubados a 4°C *overnight*. O líquido com excesso de parafina foi eliminado, e os tubos receberam solução de lise, solução de proteinase K e solução de precipitação de proteínas, conforme protocolo do kit para extração de DNA de material parafinizado (Qiagen). Trinta microlitros de água ultrapura foram utilizados para ressuspender o DNA, que foi, então, armazenado em *freezer* para posterior realização da PCR.

O éxon 10 do *TP53* foi amplificado utilizando-se protocolo de PCR descrito anteriormente, com algumas modificações. O *primer Forward* foi substituído por 5-

TAA CTT GAA CCA TCT TTT AAC TC-3 para possibilitar a obtenção de um fragmento menor, contendo 240 pb e a temperatura de anelamento foi adaptada para 61°C. A restrição enzimática com *HhaI* seguiu o protocolo padrão descrito anteriormente e a eletroforese foi realizada em gel de agarose a 3% por 1h e 10 minutos a 200V, revelando duas bandas (fragmentos com 85 e 160 pb) para amostras sem a mutação R337H *TP53*. Todas as amostras positivas para a mutação foram confirmadas por meio do sequenciamento do fragmento de 240 pb do exon 10 do *TP53*.

4.8 ACONSELHAMENTO GENÉTICO

Foram adotados alguns procedimentos ao se detectar a mutação R337H *TP53* em indivíduos submetidos ao teste.

Um dos médicos da equipe de pesquisa informava o resultado para os pais do RN (de forma presencial), alertando-os sobre a possibilidade de um deles ter transmitido a mutação para seu filho(a) e que outros parentes do lado da família portadora da mutação poderiam ser testados gratuitamente para saber se também eram portadores da mesma mutação. Os pais foram ainda orientados sobre a possibilidade de somente os filhos apresentarem a mutação sem que houvesse a presença da mesma mutação em outros parentes da mesma família (mutação *de novo*).

A probabilidade de a mutação do RN induzir ao aparecimento do tumor de córtex adrenal (TCA), segundo FIGUEIREDO *et al.* (2006a) é de aproximadamente 10%, mas partiu-se da premissa de que esta probabilidade poderia ser inferior na população geral considerando o cálculo apenas para o TCA, ou superior caso fossem considerados os demais tipos de câncer. No aconselhamento genético foi sugerido que os pais ficassem em alerta sobre os sinais e sintomas do TCA (presença de pêlos na região pubiana, acne, aumento do clitóris ou pênis), além de outros sinais que apenas o médico da criança poderia identificar. Em todas as consultas médicas houve o convite para que outros familiares participassem do projeto, a fim de facilitar a obtenção de informações sobre o histórico familiar de câncer e a construção do heredograma da família, assim como orientar a todos sobre os riscos e cuidados com a possibilidade de desenvolvimento de outros tipos de câncer em adultos e crianças.

A equipe deste projeto distribuiu todo material didático necessário a fim de capacitar o médico indicado para acompanhar a criança a fazer o aconselhamento genético dos familiares. Para a maioria das famílias foi oferecido o acompanhamento e aconselhamento genético em Curitiba, no Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe. No entanto, para atender às necessidades de famílias com residência distante de Curitiba, foi oferecida a possibilidade de realizar estes procedimentos em qualquer outro lugar do Estado.

O material para treinamento médico sobre sinais e sintomas do TCA incluiu uma lista de artigos científicos, vídeos, aulas gravadas e palestras divulgadas por meio da telemedicina em tempo real e disponibilizados no site www.curadota.org.br.

Apesar da quantidade de informações disponibilizadas no treinamento à distância aos pediatras, foi desaconselhado que eles passassem informações complicadas e estressantes para os pais dos RN. Todos os pais e familiares participantes do projeto receberam uma cartilha e um vídeo com um conteúdo apresentado em linguagem simples e contendo grande parte do aconselhamento genético (também disponíveis no site www.curadota.org.br). Além de todo esse material, a equipe da pesquisa esteve sempre disponível aos médicos e familiares de todas as cidades, objetivando esclarecer possíveis dúvidas remanescentes e auxiliá-los a preencher os dados pontuais solicitados no prontuário. O meio de comunicação mais usado foi o telefone.

O primeiro contato com os pais do RN com teste positivo aconteceu por intermédio do coordenador deste projeto. Normalmente este contato era feito com a mãe do RN, pois é a pessoa que normalmente autoriza a realização do teste no RN. Para os pais que estavam muito distantes de Curitiba, este contato aconteceu por telefone. Nesta conversa inicial, os pais foram informados sobre o rastreamento neonatal para a prevenção de um câncer em crianças que precisa ser precocemente identificado para ser curável em quase 100% dos casos. Também foi dito que qualquer criança, em qualquer lugar do mundo, pode desenvolver esse tipo de tumor, porém no Estado do Paraná o tumor ocorre quase sempre na criança com uma alteração no DNA chamada de mutação R337H no gene *TP53*. A mãe era informada que o teste realizado na sua criança indicou a presença dessa alteração, enfatizando que isso não significa que a criança desenvolverá o tumor. Dessa forma, a mãe (ou os pais) era(m) esclarecida(os) de que a criança que nasce com essa alteração no DNA tem grande probabilidade de nunca apresentar qualquer tipo de

câncer e que a intenção da equipe da pesquisa é garantir o melhor para seu filho(a), oferecendo gratuitamente seus préstimos apresentados em detalhes na cartilha e no vídeo. Durante essa etapa (cerca de 1-2 meses), nada foi feito até que os pais da criança esclarecessem todas as suas dúvidas, inclusive aquelas referentes ao incômodo psicológico decorrente das consultas frequentes e da realização de exames complementares, bem como da insegurança de assumir um risco, mesmo que pequeno (esperado < 10%) de desenvolver um tipo de câncer. De qualquer forma, os pais ficavam com o vídeo e com a cartilha, que já são bastante esclarecedores para alertar sobre os primeiros sinais de aparecimento do tumor.

O risco de desenvolvimento de TCA na faixa etária acima de 4 anos é muito baixo. Isso confirma a estatística de diagnóstico mais frequente do TCA antes dos 4 anos de idade (PEREIRA *et al.*, 2004; MICHALKIEWICZ *et al.*, 2004). A faixa etária deve ser ainda mais baixa, considerando-se os habituais atrasos de 0,5 a 2 anos para a conclusão diagnóstica. O compromisso de acompanhamento desta pesquisa, portanto, se prolongará até que a criança atinja 15 anos de idade. Foi explicado aos pais que, acima de 15 anos, a probabilidade de desenvolver o mesmo tipo de tumor ou outro tipo de câncer é muito pequena em relação à população em geral e que, dessa forma, não se aconselha nenhum protocolo adicional de acompanhamento.

A comunicação entre a equipe da pesquisa e os familiares foi feita com cuidado, sempre de forma presencial, a fim de minimizar o impacto psicológico. As situações com maior impacto psicológico foram raras e exigiram relacionamentos individualizados com a equipe multidisciplinar deste projeto. A equipe esteve atenta para esclarecer dúvidas quanto a presença da mutação entre os familiares do RN identificado no rastreamento e procurou eliminar o estigma sobre aqueles que a possuem. Em uma etapa posterior, ao realizar o acompanhamento do RN e o aconselhamento dos adultos, essas pessoas receberam informações de forma mais detalhada sobre a maior possibilidade de cura por meio do diagnóstico precoce do TCA nas crianças que fizessem o acompanhamento ambulatorial e a necessidade de orientação aos adultos sobre a possibilidade de aparecimento de outros tipos de câncer (sobretudo câncer de mama e de estômago).

Além do suporte da equipe multidisciplinar, do material impresso (cartilha) e gravado (DVD), foi disponibilizado um site de apoio (www.curadotca.org.br) para as famílias e para os profissionais de saúde. Neste site é possível fazer o *download* de todos os materiais disponíveis (cartilha, gravação de orientação, literatura sobre o

assunto, etc.) e também fazer contato por email com a equipe e ter acesso à sala de telemedicina (VERTEX) para a comunicação entre a equipe multidisciplinar e os profissionais de saúde do interior do Estado, visando o ensino à distância e segunda opinião médica em tempo real.

Há de se considerar que o TCA constitui um problema de saúde pública e que cresce com o aumento populacional (PIANOVSKI *et al.*, 2006a). O que dizer sobre os outros 90% de portadores da mutação R337H *TP53* que não desenvolveram o tumor? Nas gerações futuras, haverá possibilidade de aparecimento do tumor. Existe um trauma psicológico para aqueles que aceitam enfrentar o acompanhamento e será ainda maior quando houver o desenvolvimento do tumor nas crianças cujas mães não aderiram à campanha. Entretanto, foram omitidas quaisquer informações que pudessem exercer alguma forma de pressão psicológica para que os voluntários aceitassem participar da pesquisa.

4.9 PROCOTOLO DE VIGILÂNCIA AMBULATORIAL DOS RN PORTADORES DA MUTAÇÃO R337H *TP53*

O objetivo do protocolo foi diagnosticar precocemente o TCA, evitando-se que o tumor atinja um tamanho ou condições de estadio II, III e IV. As crianças com teste positivo tiveram acompanhamento no local de sua residência ou em Curitiba e sempre puderam contar todo o apoio da equipe do projeto.

Para as crianças que tiveram um diagnóstico confirmado de TCA, foi oferecido o tratamento completo em Curitiba, seguindo o protocolo internacional adotado pelo COG (*Children Oncology Group*). Este protocolo foi originalmente proposto por BERRUTI *et al.* (1998) para adultos com diagnóstico de TCA e, em seguida, foi adaptado pela Dra. Mara A.D. Pianovski para a faixa etária pediátrica (ZANCANELLA *et al.*, 2006). A partir de 2007, passou a ser adotado pelo COG.

A frequência das consultas dos RN e familiares abaixo de 15 anos de idade nos municípios das 22 regionais de saúde, projetada em função do risco / faixa etária de aparecimento do tumor, foi:

- Intervalo de 4 meses: crianças até 4 anos de idade,
- Intervalo de 6 meses: crianças de 5 a 7 anos de idade,
- Intervalo de 12 meses: crianças de 8 a 15 anos de idade.

O protocolo das consultas e as informações que foram fornecidas pelo médico do RN com teste positivo foi composto por:

- Exame clínico (4/4, 6/6 ou 12/12 meses): procurar sinais e sintomas de virilização (comedões ou acne, voz grave, pilificação precoce, espessa e aumentada, sobretudo em região pubiana, hipertrofia de clítoris ou aumento do tamanho do pênis para a idade, hipertrofia muscular, aceleração na velocidade do crescimento etc.), de síndrome de Cushing (obesidade centrípeta, hiperemia malar, facies em lua cheia, hipertensão arterial, retardo no crescimento estatural, irritabilidade etc.) ou uma clínica mista (sinais e sintomas de virilização e de Cushing). Para os casos de tumor não funcionante (baixa ou ausência de elevação de hormônios, sem causar manifestação clínica de origem hormonal), verificar a presença de uma massa abdominal à palpação, circulação colateral no abdômen, ou mais comumente, achados puramente acidentais nos mais variados estádios. Apresentações menos comuns em crianças do que em adultos, relacionam-se com feminização ou síndrome de Conn.

- Exames de imagens (6/6 ou 12/12 meses): o exame de rotina mais adequado e sem exposição à irradiação foi definido como sendo a ecografia de última geração. Sempre que surgiram dúvidas em qualquer tipo de exame, a preferência era repetir a ecografia abdominal, e na medida do possível, um exame de ressonância magnética nuclear (RMN). Somente quando não era possível realizar a RMN era, então, solicitada uma tomografia computadorizada (TC).

- Exames hormonais basais (4/4, 6/6 ou 12/12 meses): a cada 4 meses avaliar os níveis de SDHEA, testosterona total e cortisol.

- Teste de Supressão com Dexametasona (TSD): exame indicado para crianças com níveis hormonais acima do limite normal em duas ou mais amostras de sangue coletadas em momentos diferentes, sem apresentar imagem sugestiva de TCA em duas ecografias e uma RMN ou TC. Realizar o teste de supressão com baixa dose de dexametasona (20µg/kg), administrada de 6/6 horas (com dose máxima de 0,5mg) durante 2 dias consecutivos (STREET *et al.*, 1997). Os casos que precisaram esclarecimento sobre diagnóstico diferencial com hiperplasia adrenal congênita não clássica eram encaminhados para o endocrinologista.

4.10 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO DOS SUJEITOS VOLUNTÁRIOS

Indivíduos que não atenderam aos critérios de inclusão desta pesquisa:

- aqueles em que a mutação R337H *TP53* não foi confirmada;
- menores de idade cuja mãe ou seu guardião legal não autorizou a sua inclusão no projeto ou o adulto que se recusou a continuar no estudo.

4.11 ANÁLISE DOS RISCOS E BENEFÍCIOS

Embora este estudo tenha sido primariamente não terapêutico, a descoberta precoce de um TCA obrigou, necessariamente, a seguir um protocolo de tratamento. Neste caso, a equipe de trabalho deste projeto orientou os pais e os médicos da criança para que tivessem o melhor tratamento possível nos centros especializados onde atuavam os membros da equipe, ou no lugar de preferência da família.

Considerou-se também a possibilidade de haver risco na punção para a coleta de sangue do pezinho dos RN ou polpa digital dos familiares acima de 5 anos de idade, por ter ocasionado dor, inflamação etc., o que foi contornado pelo suporte da equipe multidisciplinar.

Os pais e familiares de um RN positivos para a mutação também poderiam estar sujeitos aos mesmos riscos relacionados à punção e, portanto, receberam suporte da equipe, incluindo-se o acompanhamento com psicólogos. A identificação do RN e nomes dos parentes foi mantida em sigilo. Considerou-se que uma criança com diagnóstico de TCA neste projeto estava nas mesmas condições de qualquer outra criança que necessitasse de internação hospitalar e cirurgia e, portanto, deveria ser submetida aos protocolos de cada hospital e às suas estatísticas de sucesso, sem interferência da equipe de trabalho. Entretanto, os pesquisadores estiveram sempre em comunicação com a família e com os profissionais dos hospitais para evitar riscos para a criança em tratamento.

4.12 DECLARAÇÃO DE USO ESPECÍFICO DO MATERIAL COLETADO

No TCLE existe uma declaração afirmando que qualquer amostra de sangue a ser analisada não seria utilizada para formação de banco de amostras nem para qualquer outro tipo de análise sem prévia consulta e autorização com nova

assinatura de TCLE aprovado por um comitê de ética e reconhecido pela CONEP (ANEXOS 2 e 4).

4.13 ANÁLISES ESTATÍSTICAS PARA R337H *TP53* E TCA

Aplicou-se o teste do qui quadrado (com intervalo de confiança de 95%) para analisar a possibilidade de uma diferença significativa nos valores de prevalência da mutação R337H *TP53* obtidos para as Regionais de Saúde do Paraná.

Para estimar a incidência da mutação R337H no Estado do Paraná, assumiu-se que a frequência desta mutação atingiu o equilíbrio de Hardy-Weinberg e, portanto, considerou-se que a coorte de RN do rastreamento foi uma amostra representativa da população total do Estado do Paraná. Usando a média da população de regiões específicas e as taxas de positividade para R337H determinada a partir dos RN do rastreamento para as mesmas regiões, foi possível estimar a taxa de incidência da mutação R337H *TP53* e o intervalo de confiança de 95% para cada região específica e também da população total do Estado, conforme TABELA 1.

Para se calcular a taxa anual de incidência do TCA em crianças de 0 a 4 anos e 11 meses de idade no Paraná, foi primeiramente calculado o número médio de RN vivos por ano, considerando-se os últimos 5 anos (2005 a 2009 = 152.330, segundo dados obtidos de www.sesa.gov.br), para cada uma das 22 regionais de saúde do Estado (FIGURA 1 e TABELA 1). Usando as taxas de prevalência para a mutação R337H, específica para cada região avaliada e determinada a partir da coorte de RN do rastreamento, calculou-se o número estimado de RN negativos para R337H / ano e o número de RN positivos para R337H / ano, considerando o número correspondente de pessoas / ano para coorte de nascimento de 2005 a 2009. Utilizando os casos observados de TCA entre as crianças do rastreamento (positivas e negativas para a mutação), as taxas correspondentes de incidência de TCA foram, então, aplicadas para obter a incidência anual estimada de TCA no Paraná para a população de 0 a 4 anos e 11 meses de idade.

Para estimar a penetrância da mutação R337H para o TCA por faixa etária específica em crianças portadoras da mutação identificadas pelo rastreamento neonatal, foram consideradas as informações sobre as crianças que participaram do programa de vigilância ambulatorial. A penetrância cumulativa por faixa etária

específica do TCA nesta coorte foi analisada pelo método de Kalbfleisch e Prentice (KALBFLEISCH; PRENTICE, 1980). O intervalo livre de TCA foi calculado a partir da data de nascimento até a data do diagnóstico do TCA nas crianças que desenvolveram o TCA e a partir da data de nascimento até o último registro de acompanhamento no protocolo de vigilância ambulatorial para o restante das crianças positivas para a mutação. Os mesmos dados foram também analisados para a categoria idade, computando a curva de incidência linearmente interpolada e definindo as diferenças entre dois anos consecutivos como a penetrância para o TCA entre dois anos. O erro padrão e o intervalo de confiança de 95% foram calculados em cada grupo específico de faixa etária, utilizando amostragem *Bootstrap* com 10.000 repetições *bootstrap*.

O teste de Wilcoxon *rank-sum* foi utilizado para comparar as diferenças de idade ao diagnóstico, tamanho / peso do TCA, duração das manifestações clínicas antes do diagnóstico entre as crianças (RN e parentes) que participaram do protocolo de vigilância ambulatorial (Grupo A no QUADRO 2) e entre aquelas que se recusaram a participar do protocolo ou não cumpriram com os critérios do protocolo de vigilância ambulatorial (Grupo B no QUADRO 2). O teste exato de Fisher foi usado para testar a diferença do tratamento entre os dois grupos de pacientes. Em todos os cálculos assumiu-se que os RN testados formavam uma amostra representativa da população total.

4.14 ANÁLISES ESTATÍSTICAS PARA R337H TP53 EM CPC

A taxa de sobrevida para os casos de CPC positivos para a mutação germinativa R337H TP53 foi comparada com aquela para os casos de tumores negativos para a mutação mediante a utilização do método de Kaplan-Meier. O Teste do qui quadrado ou o teste exato de Fischer foram aplicados para comparar as variáveis entre os grupos. O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis foi utilizado para comparar as variáveis contínuas. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

4.15 FINANCIAMENTO

Esta pesquisa foi financiada pela Secretaria de Estado da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior do Paraná (SETI), pelo Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe (Associação Hospitalar de Proteção à Infância Dr. Raul Carneiro), pela Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná, pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Secretaria de Estado da Saúde do Governo do Paraná (SESA).

5 RESULTADOS

5.1 PREVALÊNCIA DA MUTAÇÃO R337H *TP53* NO ESTADO DO PARANÁ

De dezembro/2005 até março/2010, 171.649 RN foram avaliados de um total de 180.000 mães que receberam o convite para participar do estudo de triagem neonatal. Este número representa aproximadamente 22% do total esperado de RN durante o período do estudo (761.650) no Estado do Paraná. Dos 171.649 RN testados, 461 (0,27%) apresentaram um teste positivo para a presença da mutação R337H no gene *TP53*. A prevalência global da mutação para o Estado do Paraná foi de 2,69/1000 RN (0,27% com intervalo de confiança de 95%, 0,24 a 0,29%). A prevalência da mutação calculada para cada Regional de Saúde do Estado variou de 0,75/1000 (0,07% com intervalo de confiança de 95%, 0,001 a 0,27%) na Regional de Saúde VIII até 5,14/1000 (0,51% com intervalo de confiança de 95%, 0,30 a 0,81%) na Regional de Saúde XXI. A prevalência média da mutação foi de 2,47/1000 (TABELA 1).

TABELA 1 - DADOS DEMOGRÁFICOS DO ESTADO DO PARANÁ POR REGIONAL DE SAÚDE E PREVALÊNCIA DA MUTAÇÃO R337H TP53.

Regionais de Saúde	<1 ano ¹	0-4a11m	População Total do PR	RN testados com resultado Negativo (por Regional)	RN testados com resultado Positivo (por Regional)	Prevalência /1000 RN
I	4.374	25.559	256.917	5.335	15	2,80
II	48.309	291.065	3.357.681	66.713	176	2,63
III	9.785	56.825	584.687	13.354	47	3,51
IV	2.468	15.350	161.927	2.800	8	2,85
V	7.600	48.370	458.681	10.003	27	2,69
VI	2.682	17.024	170.597	3.452	8	2,31
VII	3.981	23.836	251.107	3.255	9	2,76
VIII	4.400	28.736	335.640	2.682	2	0,75
IX	6.612	43.725	457.029	8.148	16	1,96
X	7.318	45.783	518.501	8.192	21	2,56
XI	4.451	27.302	338.254	5.039	15	2,98
XII	3.360	19.628	265.321	3.910	8	2,04
XIII	1.865	11.117	142.431	2.666	3	1,12
XIV	3.532	20.685	260.181	2.535	5	1,97
XV	9.006	52.823	712.623	2.919	5	1,71
XVI	4.717	27.337	346.377	4.682	10	2,13
XVII	11.414	68.543	873.898	8.538	26	3,04
XVIII	3.114	19.119	232.703	3.587	6	1,67
XIX	3.853	23.390	280.913	5.826	28	4,78
XX	4.567	27.263	357.046	905	1	1,10
XXI	2.969	18.157	177.330	3.485	18	5,14
XXII	1.953	12.427	146.384	1.589	6	3,76
Outros ²				1.573	1	0,64
Total	152.330	754.128	10.686.228	171.188	461	2,69 ³ 2,47 ⁴

FONTE: A autora (2011)

NOTA - ¹Número médio de crianças abaixo de 1 ano de idade no período de 2005 a 2009 por Regional de Saúde do Estado do Paraná. ²Outros: RN que foram testados, porém residem em outros Estados próximos ao Paraná. ³Prevalência global para o Estado do Paraná. ⁴Prevalência Média. População do Estado do Paraná (por faixa etária) obtido a partir de SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DO GOVERNO DO PARANÁ, 2009. Acesso em 10/set/2010.

Os valores de prevalência obtidos para as Regionais de Saúde do Paraná não estão distribuídos homogeneamente no Estado, conforme ilustrado na FIGURA 4. As Regionais de Saúde VIII, XIII e XX apresentaram uma prevalência abaixo de um desvio padrão da prevalência média (2,47/1000), assim como as Regionais XIX, XXI e XXII apresentaram valores de prevalência acima de um desvio padrão.

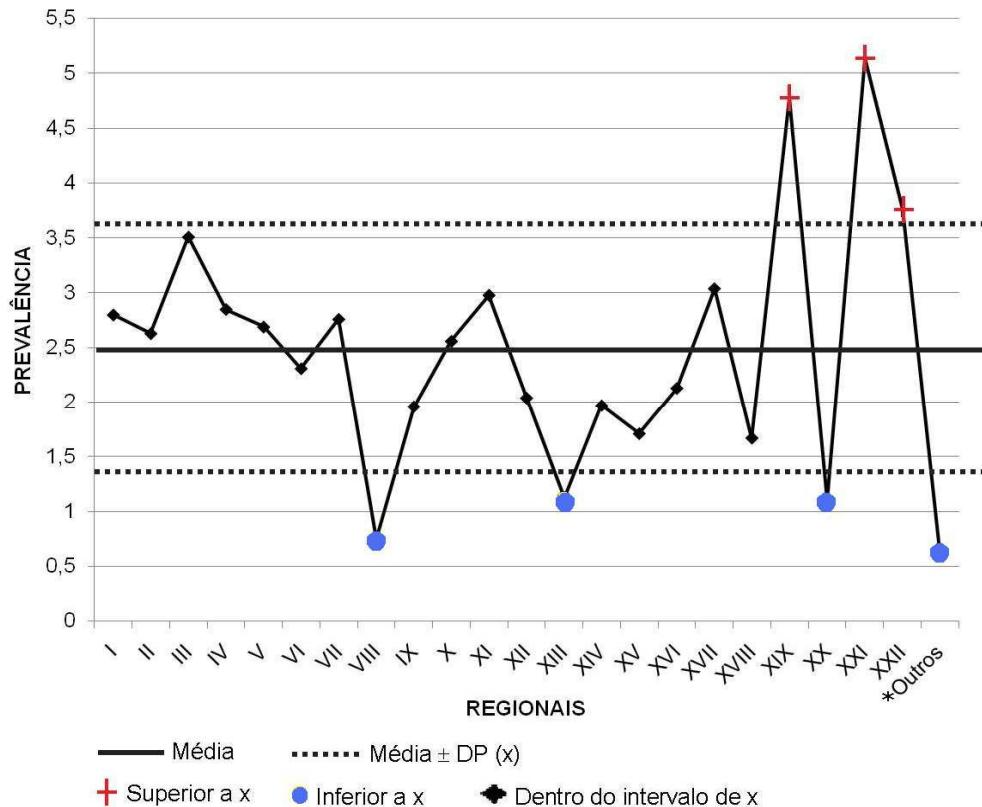


FIGURA 4 – VALORES DE PREVALÊNCIA POR REGIONAL DE SAÚDE DO PARANÁ

FONTE – A autora (2011)

NOTA – *Outros: RN testados de outros Estados, não residentes no Paraná.

Aplicando-se o teste do qui quadrado (χ^2) entre os valores observados e esperados de RN negativos (χ_A^2) e positivos (χ_B^2) para a mutação R337H nas Regionais de Saúde do Estado (TABELA 2), observou-se uma diferença significativa ($p < 0,05$) para as Regionais de Saúde XIX ($p = 0,002$) e XXI ($p = 0,005$), cujos valores observados de RN positivos foram superiores aos valores esperados. Em contrapartida, a Regional VIII ($p = 0,005$) apresentou o menor valor de prevalência no Estado e o número observado de RN positivos foi inferior ao número esperado. Os valores somados de $\chi_A^2 + \chi_B^2$ para as Regionais de Saúde XIX e XXI (46,33%) ou

para as Regionais VIII, XIX e XXI (56,48%) em relação ao total para todas as Regionais de Saúde do Estado ($\chi_A^2 + \chi_B^2 = 37,64$; $\chi^2 = 33,92$) indicam que a distribuição da mutação R337H não está em equilíbrio de Hardy-Weinberg no Paraná, devendo existir algum fator determinante para a diferença dos valores de prevalência obtidos para estas Regionais de Saúde e que, portanto, esta diferença não pode ser atribuída ao acaso. Fatores ambientais ou relacionados a movimentos migratórios no período de colonização do Estado podem estar relacionados a estas diferenças. No entanto, estudos adicionais devem ser realizados para confirmar estas hipóteses.

TABELA 2 – ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS OBTIDOS E ESPERADOS POR REGIONAL DE SAÚDE DO ESTADO DO PARANÁ

Regionais	Negativos		Positivos		<i>p</i> -valor	χ^2_A	χ^2_B
	Observados	Esperados	Observados	Esperados			
I	5.335	5336	15	14	0,8675	0,0001	0,0277
II	66.713	66709	176	180	0,7854	0,0002	0,0739
III	13.354	13365	47	36	0,0661	0,0091	3,3673
IV	2.800	2800	8	8	0,8672	0,0001	0,0279
V	10.003	10003	27	27	0,9904	0,0000	0,0001
VI	3.452	3451	8	9	0,6711	0,0005	0,1798
VII	3.255	3255	9	9	0,9370	0,0000	0,0062
VIII	2.682	2677	2	7	0,0521	0,0101	3,7634
IX	8.148	8142	16	22	0,2051	0,0043	1,6017
X	8.192	8191	21	22	0,8216	0,0001	0,0507
XI	5.039	5040	15	14	0,6982	0,0004	0,1499
XII	3.910	3907	8	11	0,4362	0,0016	0,6048
XIII	2.666	2662	3	7	0,1190	0,0065	2,4237
XIV	2.535	2533	5	7	0,4849	0,0013	0,4865
XV	2.919	2916	5	8	0,3080	0,0028	1,0365
XVI	4.682	4679	10	13	0,4631	0,0014	0,5370
XVII	8.538	8541	26	23	0,5311	0,0011	0,3912
XVIII	3.587	3583	6	10	0,2394	0,0037	1,3804
XIX	5.826	5838	28	16	0,0019	0,0258	9,5881
XX	905	904	1	2	0,3575	0,0023	0,8442
XXI	3.485	3494	18	9	0,0050	0,0211	7,8466
XXII	1.589	1591	6	4	0,4063	0,0019	0,6876
Outros ²	1.573	1570	1	4	0,1160	0,0066	2,4639
Total	171.188		461			0,1011	37,5393
		(A + B) para XIX e XXI = 17,44 (46,33%) (A + B) para VIII, XIX e XXI = 21,25 (56,48%)				Total $\chi^2_A + \chi^2_B = 37,64033$ χ^2 crítico = 33,92	

FONTE: A autora (2011).

A população do Estado do Paraná, o número de RN testados, o número de parentes (crianças e adultos) com a mutação R337H e o número de casos de TCA em crianças (diagnosticados durante este estudo e outros casos de TCA informados pela família) são mostrados na TABELA 3.

TABELA 3 – RESULTADOS ENCONTRADOS POR REGIONAL DE SAÚDE DO ESTADO DO PARANÁ (CONTINUA)

Regionais de Saúde	<1 ano ¹	0-4a11m	População Total do PR	RN testados com resultado Negativo (por Regional)	RN testados com resultado Positivo (por Regional)	Prevalência/ 1000 RN	Total de Familiares testados	Familiares (resultado Positivo)	TCA desenvolvidos durante o estudo	
									RN	Parentes
I	4.374	25.559	256.917	5.335	15	2,80	49	27	-	-
II	48.309	291.065	3.357.681	66.713	176	2,63	753	321	6 ³	
III	9.785	56.825	584.687	13.354	47	3,51	249	103	-	-
IV	2.468	15.350	161.927	2.800	8	2,85	49	17	-	-
V	7.600	48.370	458.681	10.003	27	2,69	248	87	-	-
VI	2.682	17.024	170.597	3.452	8	2,31	58	28	-	-
VII	3.981	23.836	251.107	3.255	9	2,76	46	18	-	-
VIII	4.400	28.736	335.640	2.682	2	0,75	18	4	-	-
IX	6.612	43.725	457.029	8.148	16	1,96	72	33	3 ³	-
X	7.318	45.783	518.501	8.192	21	2,56	133	66	1	1
XI	4.451	27.302	338.254	5.039	15	2,98	68	24	-	-
XII	3.360	19.628	265.321	3.910	8	2,04	50	24	1	-
XIII	1.865	11.117	142.431	2.666	3	1,12	24	11	-	-
XIV	3.532	20.685	260.181	2.535	5	1,97	17	7	-	1
XV	9.006	52.823	712.623	2.919	5	1,71	39	13	-	1
XVI	4.717	27.337	346.377	4.682	10	2,13	54	21	-	1

TABELA 3 – RESULTADOS ENCONTRADOS POR REGIONAL DE SAÚDE DO ESTADO DO PARANÁ (CONCLUSÃO)

Regionais de Saúde	<1 ano ¹	0-4a11m	População Total do PR	RN testados com resultado Negativo (por Regional)	RN testados com resultado Positivo (por Regional)	Prevalência /1000 RN	Total de Familiares testados	Familiares (resultado Positivo)	TCA desenvolvidos durante o estudo	
									RN	Parentes
XVII	11.414	68.543	873.898	8.538	26	3,04	217	75	1	2
XVIII	3.114	19.119	232.703	3.587	6	1,67	68	34	-	-
XIX	3.853	23.390	280.913	5.826	28	4,78	247	101	-	-
XX	4.567	27.263	357.046	905	1	1,10	1	1	-	-
XXI	2.969	18.157	177.330	3.485	18	5,14	106	46	1	-
XXII	1.953	12.427	146.384	1.589	6	3,76	36	12	-	-
Outros²				1.573	1	0,64	10	6	-	-
Total	152.330	754.128	10.686.228	171.188	461	2,69⁴ 2,47⁵	2612	1079	19	

FONTE: A autora (2011)

NOTA - ¹Média do número de crianças abaixo de 1 ano de idade nos período de 2005-2009 por Regional de Saúde do PR. ²RN testados que residem em outros Estados próximos ao PR. TCA incluindo casos novos e casos anteriores ao estudo, informados pelas famílias (41 casos em crianças e 3 casos em adultos). ³Casos de TCA sem a mutação R337H *TP53*. ⁴Prevalência global para o Estado do Paraná. ⁵Prevalência Média.

Abreviações: TCA, Tumor de Córtex Adrenal. População do Estado do Paraná (por faixa etária) obtido a partir de SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DO GOVERNO DO PARANÁ, 2009. Acesso em 10/set/2010.

Dos 461 RN detectados com a mutação R337H, 11 desenvolveram TCA durante o período deste estudo (FIGURA 5). Portanto, a penetrância global estimada para o TCA durante o período deste estudo (faixa etária de 0,8 a 4,6 anos) é de 2,39% (11/461).

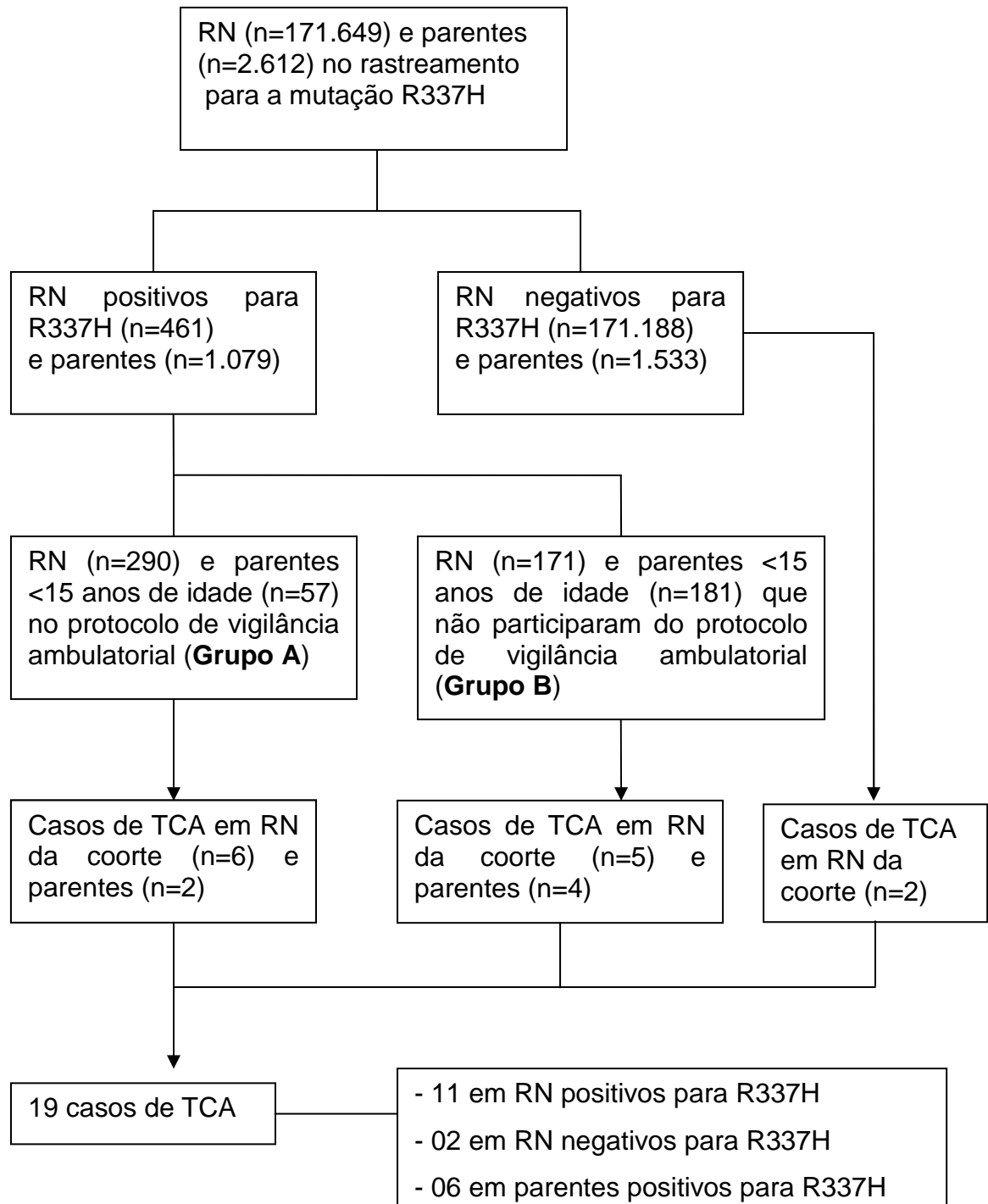


FIGURA 5 - RASTREAMENTO NEONATAL PARA A MUTAÇÃO R337H E PROTOCOLO DE VIGILÂNCIA AMBULATORIAL
 FONTE: A autora (2011)

Foram diagnosticados dois casos de TCA entre os RN que participaram do rastreamento neonatal, mas que foram negativos para a mutação R337H. Nestes dois casos, a presença dos dois alelos selvagens no *TP53* foi confirmada por sequenciamento do exon 10 do gene *TP53*. Considerando-se que os RN testados (171.649) no Estado do Paraná representam uma amostra aleatória e considerando todos os casos de TCA (n=13) diagnosticados em crianças que participaram do rastreamento neonatal, a média da incidência anual do TCA no Estado do Paraná foi de 27,6 por milhão de crianças abaixo de 5 anos de idade ($20,8 \times 10^{-6}$ a $34,4 \times 10^{-6}$ utilizando o método de Aproximação em Larga Escala e intervalo de confiança de 95%), e de $21,1 \times 10^{-6}$ a $35,3 \times 10^{-6}$ (usando o Método Exato). Os resultados representam a soma das 2 taxas de incidências encontradas na população geral negativa para a mutação R337H e para os casos positivos, 4,4 e 23,2 por milhão de crianças abaixo de 5 anos de idade, respectivamente. Em suma, o número estimado de novos casos de TCA por ano é de 15 a 25 no Estado do Paraná.

5.2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E BIOLÓGICAS DOS TCA DIAGNOSTICADOS DURANTE ESTE ESTUDO

Trezentas e quarenta e sete crianças portadoras da mutação R337H *TP53* participaram do protocolo de vigilância ambulatorial (Grupo A). Este total corresponde a 290 crianças que foram identificadas pelo rastreamento neonatal e 57 parentes abaixo de 15 anos de idade que são portadores da mutação R337H. Entre as crianças do Grupo A, oito desenvolveram o TCA (seis delas são crianças do rastreamento neonatal).

O Grupo B corresponde a 171 RN portadores da mutação, identificados pelo rastreamento e 181 parentes abaixo de 15 anos de idade, portadores da mutação R337H. Os parentes destas crianças foram convidados a participar do protocolo de vigilância ambulatorial, mas não aceitaram. Outros 29 RN participaram inicialmente do protocolo de vigilância ambulatorial, mas desistiram ou participaram parcialmente, não sendo possível realizar as consultas e os exames seguindo o protocolo completo. Finalmente, parentes de 30 RN não responderam ao convite para participar do protocolo de vigilância ambulatorial. Entre estas 352 crianças que foram convidadas, mas não participaram do protocolo de vigilância ambulatorial, nove desenvolveram o TCA (cinco do grupo de coorte de RN do rastreamento). Os

achados clínicos e biológicos dos dois pacientes que desenvolveram o TCA, tendo participado do rastreamento e apresentado um resultado negativo para a mutação R337H, foram incluídos no Grupo B para possibilitar a comparação dos dados obtidos.

A idade mediana ao diagnóstico das 15 meninas e 4 meninos que desenvolveram o TCA (17 carcinomas e 2 adenomas) foi de 13 meses (variando entre 3 a 112 meses). As características clínicas e biológicas das 19 crianças de acordo com sua participação no protocolo de vigilância ambulatorial estão relacionadas no QUADRO 2.

QUADRO 2 - DADOS CLÍNICOS E BIOLÓGICOS DE CRIANÇAS QUE DESENVOLVERAM O TCA DURANTE O PERÍODO DO ESTUDO (CONTINUA)

Grupo	Idade (meses)	Sexo	Manifestação Clínica	Tumor			Estadio	Tratamento		Resultado	Acompanhamento (meses)
				Peso (g)	Volume (cm ³)	Histologia		Cirurgia	Quimioterapia		
A	28	F	Virilização	30	35	Carcinoma	I	Sim	Não	SED	34
A	23	F	Virilização	35	52	Carcinoma	I	Sim	Não	SED	32
A	3	F	Virilização + Cushing	45	50	Carcinoma	I	Sim	Não	SED	33
A	15	F	Virilização	20	27	Carcinoma	I	Sim	Não	SED	32
A	28	F	Virilização	22	37	Carcinoma	I	Sim	Não	SED	22
A	23	F	Nenhuma**	17	18	Carcinoma	I	Sim	Não	SED	21
A	22	M	Nenhuma**	1	0,6	Adenoma	I	Sim	Não	SED	16
A	112	M	Nenhuma**	31	38.7	Carcinoma	I	Sim	Não	SED	9
B	6	F	Virilização + Cushing	40	46	Carcinoma	I	Sim	Não	SED	56
B	11	F	Virilização	160	160	Carcinoma	I	Sim	Não	SED	49
B	10	M	Nenhuma	580	828	Carcinoma aderido ao fígado e rim D	II	Sim	Sim	SED	48,5
B	6	F	Virilização	65	64	Carcinoma	II	Sim	Não	Recidiva em 5 meses e 16 meses após Dx.	46

QUADRO 2 - DADOS CLÍNICOS E BIOLÓGICOS DE CRIANÇAS QUE DESENVOLVERAM O TCA DURANTE O PERÍODO DO ESTUDO (CONCLUSÃO)

Grupo	Idade (meses)	Sexo	Manifestação Clínica	Tumor			Estadio	Tratamento		Resultado	Acompanhamento (meses)
				Peso (g)	Volume (cm ³)	Histologia		Cirurgia	Quimioterapia		
B	14	F	Virilização	90	137	Carcinoma	III (<i>spillage</i>)	Sim	Sim	SED	41
B	42	F	Virilização	ND	150	Carcinoma	III (<i>spillage</i>)	Sim	Sim	Morte tóxica	12
B	13	F	Virilização	60	ND	Adenoma	I	Sim	Não	SED	19
B	43	M	Virilização	ND	205	Carcinoma	III(<i>spillage</i>)	Sim	Sim	SED	14
B	41	F	Virilização	780	ND	Carcinoma	III amplo envolvimento da região	Sim	Sim	Recidiva 10 meses após tratamento	
B*	6	F	Virilização + Cushing	100	266	Carcinoma	II	Sim	Não	SED	30
B*	10	F	Virilização	70	100	Carcinoma	I	Sim	Não	SED	19

FONTE: A autora (2011)

NOTA - Abreviações: ND—não disponível; SED – sem evidência de doença; Dx—diagnóstico

*Crianças que participaram do rastreamento neonatal, mas que tiveram resultado negativo para a mutação R337H.

** Níveis elevados de SDHEA

Oito dos 19 casos de TCA ocorreram entre as 290 crianças que aderiram ao protocolo de vigilância ambulatorial. Apesar da distribuição da mutação R337H ser similar entre meninos e meninas (em torno de 50%), o TCA ocorreu mais em meninas (n=15) do que em meninos (n=4) (TABELA 4), conforme os dados obtidos de acompanhamento até Março/2010.

As crianças que participaram do protocolo de vigilância ambulatorial desenvolveram tumores significativamente menores do que aquelas que não participaram (TABELA 4 e QUADRO 2), assim como o estadio ao diagnóstico foi mais precoce. Além disso, o tratamento das crianças que foram diagnosticadas com tumores por meio do protocolo de vigilância ambulatorial foi muito mais simples (QUADRO 2). Nenhuma destas crianças necessitou de quimioterapia ou teve algum evento adverso na cirurgia. Todas elas estão vivas por períodos que variam de 9 a 55 meses. Inversamente, das 11 crianças que desenvolveram TCA e não participaram do protocolo de vigilância ambulatorial, três apresentaram eventos adversos, incluindo duas recidivas e um óbito. Ao todo, seis crianças deste grupo, incluindo uma que foi a óbito devido a complicações no tratamento, receberam ou estão recebendo quimioterapia intensiva.

TABELA 4 – ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DOS CASOS DE TCA

Características	Grupo A ¹ (n = 8)	Grupo B ² (n = 11)	Valor de p
Idade mediana ao diagnóstico (anos)	1,9	1,2	0,68 ³
Sexo			
M	2	2	0,99 ⁴
F	6	9	
Mediana do Peso do Tumor (g)	26	79	<0,001 ³
Mediana do Volume do Tumor (cm³)	33	150	0,001 ³
Estadio da doença			0,02 ⁴
I	8	4	
II		3	
III		4	
Tratamento			0,04 ⁴
Cirurgia	8	6	
Cirurgia + Quimioterapia	0	5	

FONTE: A autora (2011)

NOTA – ¹Participaram do protocolo de vigilância ambulatorial (baseado no acompanhamento até março/2010) ; ²Não participaram do protocolo de vigilância ambulatorial (baseado no acompanhamento até março/2010); ³*Wilcoxon rank-sum test* (Teste das Somas dos Postos); ⁴Teste exato de Fisher.

5.3 AVALIAÇÃO LABORATORIAL DAS CRIANÇAS PORTADORAS DA MUTAÇÃO R337H TP53

Das 347 crianças que participaram do protocolo de vigilância ambulatorial, 41 tiveram alterações nas dosagens hormonais adrenocorticais (SDHEA, cortisol, testosterona) com ultrassonografia alterada ou tiveram apenas alterações no exame de ultrassonografia (n=2), sugestivas de TCA. Em seis crianças, a presença da massa intra-abdominal foi revelada pelo exame de ultrassonografia. Os níveis dos hormônios adrenocorticais circulantes, medidos simultaneamente à realização da ultrassonografia que diagnosticou a presença de massa abdominal, mostraram-se alterados em 4/6 crianças e foram considerados normais em 2/6 crianças. Avaliações posteriores destas seis crianças confirmaram a presença de TCA em quatro crianças, neuroblastoma em uma criança e linfoma de Burkitt na outra criança. Entre 35 crianças que apresentavam níveis alterados dos hormônios adrenocorticais e ultrassonografia normal, 16 crianças mantiveram os níveis alterados dos hormônios adrenocorticais em análises posteriores. Treze destas crianças apresentaram valores considerados limítrofes usando outro sistema analítico e as outras três evoluíram para um aumento dos níveis dos hormônios adrenocorticais. Estas 16 crianças foram submetidas aos exames de ressonância magnética em outros serviços ou tomografia abdominal computadorizada e foram encontrados quatro casos com TCA, confirmados pela histopatologia. Entre os casos de TCA que apresentaram níveis elevados de um dos hormônios e ausência de imagem compatível com TCA (RMN ou TC), duas crianças tiveram diagnóstico de puberdade precoce e uma criança foi encaminhada para um endocrinologista com suspeita de hiperplasia adrenal congênita tardia. Nos outros nove casos restantes, todos tiveram bloqueio dos hormônios adrenocorticais no TSD, e, depois, apresentaram níveis de hormônios dentro da faixa de normalidade. Devido ao custo / benefício e avaliação quanto à utilidade do teste de supressão (que necessita de um exame de imagem para confirmar o TCA), foi mais prático e decisivo nos últimos dois anos restringir o TSD para os casos mais duvidosos e com níveis hormonais mais elevados (SDHEA > 35µg/dL, testosterona total > 25ng/dL e cortisol > 20µg/dL). Apenas em um caso o teste de supressão foi indicativo de TCA e confirmado mais tarde com o aparecimento da imagem em exame de RMN. O maior fator de erro na indicação do TSD foi a divergência de metodologias utilizadas por

diferentes fabricantes de kits e equipamentos para os imunoensaios comerciais que avaliam os níveis hormonais utilizados pelos vários laboratórios comerciais do Paraná. A FIGURA 6 resume os resultados obtidos no protocolo de vigilância ambulatorial.

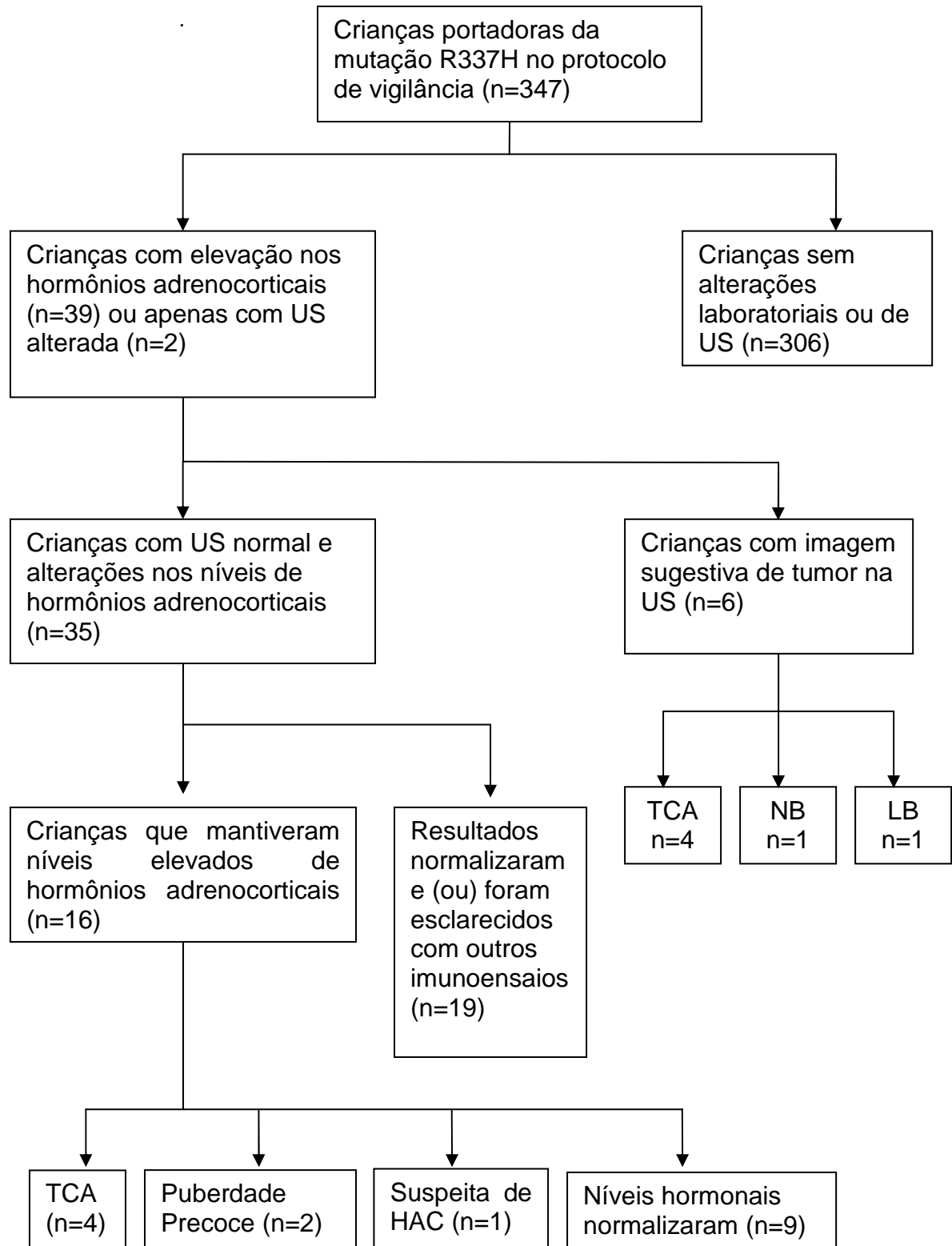


FIGURA 6 – RESULTADOS DO PROTOCOLO DE VIGILÂNCIA AMBULATORIAL EM CRIANÇAS PORTADORAS DA MUTAÇÃO R337H E QUE DESENVOLVERAM TUMORES ABDOMINAIS.

FONTE: A autora (2011)

NOTA - US- Ultrassonografia; TCA – Tumor de Córtex Adrenal; NB - Neuroblastoma; LB – Linfoma de Burkitt; HAC - Hiperplasia Adrenal Congênita.

5.4 HISTÓRICO DE CÂNCER EM FAMÍLIAS QUE PARTICIPARAM DO RASTREAMENTO NEONATAL

Foram construídos os heredogramas de todas as famílias incluídas no protocolo de vigilância ambulatorial. A partir dos 461 RN detectados com a mutação foram geradas 434 famílias com um, dois (n=21) ou três (n=3) RN positivos para a mutação. De um total de 1.540 indivíduos positivos para a mutação, três crianças herdaram o alelo R337H de ambos os pais, sendo assim homozigotas para R337H no gene *TP53*. Não houve evidência de mutação R337H *de novo*. Em 81 destas famílias não foi possível construir o heredograma e nem obter dados completos do histórico familiar de câncer devido a dificuldades de localização dos pais do RN. Para as 353 famílias restantes e que foram incluídas no protocolo de vigilância ambulatorial, o histórico de câncer foi obtido para o lado da família que segrega a mutação e também para o lado contralateral.

Em todas as 353 famílias foi possível definir o lado parenteral que segrega a mutação. A prevalência de qualquer tipo de câncer relatada entre os parentes do lado da família que segrega a mutação R337H foi maior (n=550) do que no lado contralateral sem a mutação (n=158) (QUADRO 3).

TCA		Mama	Estômago	Cérebro		Outros tumores		Total
Lado da família que segrega R337H <i>TP53</i>								550
<15anos	>15anos			<15anos	>15anos	<15anos	>15anos	
48*	3**			06	25			
51		80	79	31		309		
Contralateral								
0	0	16	13	03	05	121		158

QUADRO 3 - PRINCIPAIS TIPOS DE TUMORES ENCONTRADOS NAS FAMÍLIAS EM ACOMPANHAMENTO

FONTE: A autora (2011)

NOTA - *36 meninas e 12 meninos. **Duas mulheres e uma adolescente de 16 anos. Para a detecção da mutação R337H utilizou-se sangue periférico ou DNA extraído do tumor (no caso de indivíduos falecidos) e foi confirmada em todos os casos de TCA, em tumores de mama (n=20), estômago (n=9), cérebro (n=2) e em outros tipos de tumores (n=23). 445 indivíduos que desenvolveram tumores (do lado que segrega a mutação) ainda não foram testados (material disponível somente dos blocos de parafina, podendo resultar tanto na presença da mutação R337H como na ausência desta mutação ou na perda do alelo R337H).

O lado da família que segrega a mutação apresentou um número 3,5 vezes maior de casos de câncer (n= 550) em relação ao lado contralateral (n= 158).

Neste histórico, o tipo mais frequente de câncer encontrado entre crianças portadoras da mutação R337H foi o TCA (n=48) e tumor de cérebro (n=6). As análises do DNA genômico a partir de amostras disponíveis de sangue (n=14) ou de bloco de parafina de TCA (n=8) confirmaram a presença da mutação R337H em todas elas. Em adultos, os tipos mais frequentes de câncer relatados foram mama (n=80), estômago (n=79) e tumores de cérebro (n=25). Foram relatados três casos de TCA em adultos, todos eles positivos para a mutação R337H.

De acordo com os tipos de câncer de maior incidência no lado da família que segrega a mutação, as famílias foram classificadas em oito grupos conforme os critérios abaixo:

- Grupo 1: parentes apresentando TCA em crianças e (ou) adultos, sem qualquer outro tipo de câncer;
- Grupo 2: parentes apresentando TCA em crianças e (ou) adultos, associado com câncer de mama e (ou) estômago, sem qualquer outro tipo de câncer;
- Grupo 3: parentes apresentando TCA em crianças e (ou) adultos, associado com outros tipos de câncer, exceto mama e (ou) estômago;
- Grupo 4: parentes apresentando TCA em crianças e (ou) adultos, associado com câncer de mama e (ou) estômago + outros tipos de câncer;
- Grupo 5: parentes apresentando casos de câncer de mama e (ou) estômago + outros tipos de câncer exceto TCA;
- Grupo 6: parentes apresentando 2 ou mais casos de câncer, exceto TCA, mama ou estômago;
- Grupo 7: parentes apresentando somente 1 tipo de câncer, exceto TCA, mama ou estômago;
- Grupo 8: não houve relato de casos de câncer na família.

De acordo com esses critérios, as 353 famílias foram classificadas segundo o histórico de câncer, conforme informado na TABELA 5.

TABELA 5 - CLASSIFICAÇÃO DAS FAMÍLIAS DE ACORDO COM O HISTÓRICO DE CÂNCER

Grupos	TCA (adultos e crianças)	Ca mama	Ca estômago	Outros tipos de Ca	Nº de Famílias	%
1	Sim	Não	Não	Não	13	3,7
2	Sim	Sim	Sim	Não	02	0,6
3	Sim	Não	Não	Sim	10	2,8
4	Sim	Sim	Sim	Sim	16	4,5
5	Não	Sim	Sim	Sim	87	24,7
6	Não	Não	Não	2 ou +	32	9,1
7	Não	Não	Não	Somente 1	70	19,8
8	Não	Não	Não	Não	123	34,8
Famílias classificadas					353	100
Famílias sem Classificação					(81)	
Total de Famílias identificadas com a mutação					434	

FONTE: A autora (2011)

Foram obtidos diferentes perfis de heredogramas. A distribuição dos casos de câncer entre as famílias avaliadas foi irregular: 24,7% (87/353) das famílias relataram três ou mais casos de câncer e se enquadraram nos critérios de LF-*símile* de acordo com BIRCH (1994a), 40,5% tiveram histórico de câncer que não possibilitou o enquadramento em nenhum critério de síndrome de câncer familiar, enquanto 34,8% (123/353) das famílias, com exceção do probando com TCA, não relataram a presença de casos de câncer. De um total de 2.612 familiares testados (de todas as idades) para a mutação R337H *TP53*, 1.079 tiveram um resultado positivo para a mutação.

Os resultados obtidos para o cálculo da prevalência da mutação R337H *TP53* e avaliação do histórico de câncer nas famílias em acompanhamento no período desta coorte serão publicados, em breve, em artigo intitulado “*Neonatal Screening for the R337H TP53 Mutation and Subsequent Surveillance for Childhood Adrenocortical Tumors in the Paraná State, Brazil*”.

5.5 AVALIAÇÃO MOLECULAR DE CPC EM CRIANÇAS

No período desta coorte (2005-2010) foram encontrados cinco casos de outros tipos de câncer em crianças portadoras da mutação R337H, identificadas pelo rastreamento neonatal: um caso de neuroblastoma, um caso de glioblastoma multiforme, dois casos de CPC e um caso de linfoma de Burkitt.

O CPC é muito raro e ocorre em uma incidência similar ao do TCA, ou seja, de 0,3 / milhão de crianças abaixo de 15 anos de idade (BERGER *et al.*, 1998). Vinte e nove casos de tumores cerebrais em crianças foram incluídos neste estudo para avaliar se a incidência aumentada do CPC em crianças do Paraná (BLEGGI-TORRES *et al.*, 2004) poderia estar relacionada com a mutação R337H *TP53*. Entre os 29 casos avaliados no estudo de BLEGGI-TORRES *et al.* (2004), 22 apresentavam diagnóstico de CPC e sete de Papiloma de plexo coróide (Pp). Todos foram avaliados quanto à presença da mutação R337H *TP53* em sangue periférico (nos pacientes vivos) e também no tecido tumoral em bloco de parafina.

Das 22 crianças com diagnóstico de CPC, 14 (63,6%) eram portadoras da mutação germinativa R337H no gene *TP53* (Grupo 1 no QUADRO 4). Esta mutação foi confirmada em um dos pais (n=14) e em outros membros das famílias (33 de 115 indivíduos testados), o que eliminou a possibilidade de mutação *de novo* neste grupo. A LOH foi encontrada em 6/13 (46,1%) amostras de CPC, incluindo quatro CPC com perda do alelo selvagem do *TP53* e duas com perda do haplótipo R337H, enquanto os outros casos de CPC disponíveis (n=7) eram heterozigotos. Idade, sexo, acompanhamento e histórico familiar de câncer foram avaliados para todos os casos de CPC positivos para a mutação (Grupo 1 no QUADRO 4).

Pacientes	Sexo/Idade (anos)	Tratamento	Seguimento	Histopatologia	R337H (sangue)	R337H (DNA tumoral)	Histórico Familiar de Câncer	
							Lado R337H	Contralateral
Grupo 1							n	n
1	F / 13,6	-	Falecido	CPC	R337H/Wt***	ND	4	0
2	M / 1,8	RCC/Qt	Falecido	CPC	R337H/Wt	R337H/-	ND	1
3	M / 2,5	RCC/Qt	Falecido	CPC	R337H/Wt	- / Wt	1	1
4	F / 0,4	RCC/Qt	Falecido	CPC	R337H/Wt	- / Wt	4	0
5	M / 11	RCC/Qt	Falecido	CPC	R337H/Wt	R337H/Wt	4	0
6	M / 0,9	RCC/Qt	Vivo	CPC	R337H/Wt	R337H/Wt	3	0
7	M / 2,3	RCC/Qt	Falecido	CPC	R337H/Wt	R337H/Wt	7	ND
8	M / 6,6	RCC/Qt	Falecido	CPC	R337H/Wt	R337H/Wt	4	1
9	M / 2,9	RCC/Qt	Vivo	CPC	R337H/Wt	R337H/Wt	8	0
10	M / 1,2	RCC/Qt	Falecido	CPC	R337H/Wt	R337H/Wt	2	1
11	F / 5,9	RCC/Qt	Vivo*	CPC	R337H/Wt	R337H/ -	0	ND
12	F / 0,9	RCC/Qt	Falecido	CPC	R337H/Wt	R337H/Wt	3	ND
13	M / 4	RCC/Qt	Vivo	CPC	R337H/Wt	R337H / -	5	0
14	M / 0,08	RCC/Qt	Vivo	CPC	R337H/Wt	R337H / -	6	ND
Total				14/22 (63,6%)	13	13	51	4
Taxa de Sobrevida**			2/11 (18,1%)					

QUADRO 4 - HISTÓRICO DE CÂNCER NAS FAMÍLIAS DE CRIANÇAS POSITIVAS PARA R337H QUE DESENVOLVERAM CPC

FONTE: A autora (2011)

NOTA – RCC: Remoção Cirúrgica Completa. Qt: Quimioterapia. ND: Não Disponível. Wt (Wild-type): Alelo selvagem.

* < 5 anos sem doença; ** > 5 anos sem doença;*** Resultado da análise de DNA estimada pelo resultado dos pais.

A FIGURA 7 apresenta alguns heredogramas obtidos a partir da avaliação das famílias do Grupo 1 e os três padrões encontrados na análise de LOH: somente uma única banda de 240bp (não digerida pela *HhaI*) com a perda do alelo selvagem (FIGURA 7A, família do paciente 14); a presença de duas bandas menores, 80bp e 160bp, ilustrando ausência do alelo R337H (FIGURA 7B, família do paciente 4) e o padrão de heterozigose com todas as três bandas (FIGURA 7C, família do paciente 9). Todos os casos de CPC positivos para a mutação R337H *TP53* foram confirmados pela análise de sequenciamento do DNA do tumor do paciente ou do DNA do sangue coletado de um dos pais, ou ainda do DNA de tecido normal do cérebro ao redor do CPC.

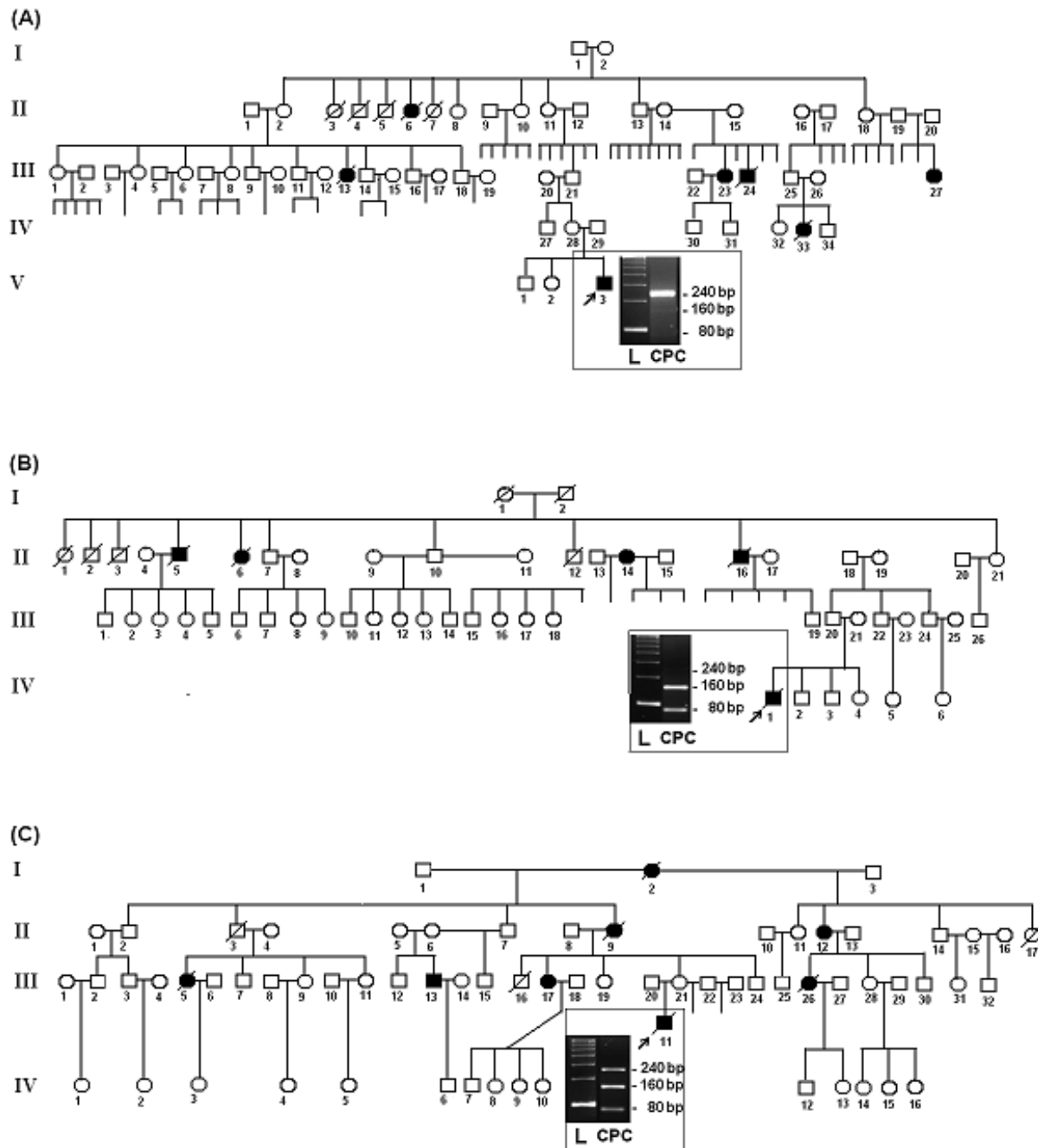


FIGURA 7 - HEREDOGRAMAS DE TRÊS FAMÍLIAS COM A MUTAÇÃO R337H *TP53*, ILUSTRANDO OS PADRÕES DE LOH ENCONTRADOS

FONTE: Reproduzido de CUSTODIO *et al.*, 2011a.

NOTA – Perda do alelo selvagem (A), perda do alelo R337H (B) e sem LOH (C).

Idade, sexo, acompanhamento e histórico familiar de câncer também foram obtidos para os pacientes do Grupo 2 (oito crianças com diagnóstico de CPC negativas para a mutação R337H) e para o Grupo 3 (sete crianças com diagnóstico de Pp também negativas para a mutação), conforme mostrado no QUADRO 5 (Grupos 2 e 3, respectivamente).

Os heredogramas das 14 famílias portadoras da mutação germinativa foram obtidos simultaneamente ao histórico familiar de câncer para ambos os lados das famílias (QUADROS 4 e 5). No Grupo 1, correspondendo aos casos de CPC positivos para a mutação R337H, o número total de parentes com câncer no lado da família que segrega a mutação (n=51) foi maior que no lado contralateral (n=4). Este número também foi muito superior quando comparado com somente 10 casos de câncer relatados do Grupo 2 (CPC negativos para a mutação) ou 6 casos de câncer do Grupo 3 (Pp negativos para a mutação). Os tipos de tumores mais comuns foram: mama (n=8, 12,1%), estômago (n=6, 9,0%), próstata (n=6, 9,0%) e TCA (n=6, 9,0%) em famílias com casos de CPC positivos para a mutação R337H. Nenhuma das famílias apresentou o padrão clássico da SLF, no entanto, LF-*símile*, como definido por BIRCH (1994a), foi identificada em sete de 14 famílias portadoras da mutação R337H (50%) ou em seis de 14 famílias portadoras da mutação R337H (42,85%), de acordo com a definição de TINAT *et al.* (2009). O histórico de câncer em famílias negativas para a mutação R337H apresentou 12,5% de famílias com critérios para LF-*símile* no Grupo 2 e nenhuma família classificada do Grupo 3.

Paciente	Sexo/Idade (anos)	Tratamento	Seguimento	Histopatologia	R337H (sangue)	R337H DNA do Tumor	Histórico Familiar de Câncer	
							Lado 1*	Lado 2
Grupo 2							n	n
15	F / 9,2	RCC/Qt	Falecido	CPC	Neg	Neg	2	0
16	M / 1,3	RCC/Qt	Falecido	CPC	Neg	Neg	2	1
17	M / 4,9	RCC/Qt	Falecido	CPC	Neg	Neg	5	1
18	M / 0,2	RCC/Qt	Falecido	CPC	Neg	Neg	2	0
19	F / 3,0	RCC/Qt	Falecido	CPC	Neg	Neg	0	0
20	M / 0,3	RCC/Qt	Vivo	CPC	Neg	Neg	0	0
21	M / 0,7	RCC/Qt	Vivo	CPC	Neg	Neg	1	0
22	F / 1,7	RCC/Qt	Falecido	CPC	Neg	Neg	0	0
Grupo 3								
23	M / 5,8	RCC	Vivo	Pp	Neg	Neg	2	1
24	F / 0,7	RCC	Falecido	Pp	Neg	Neg	2	1
25	F / 0,8	RCC	Falecido	Pp	Neg	Neg	3	1
26	F / 9,8	RCC	Vivo	Pp	Neg	Neg	0	0
27	F / 1,0	RCC	Vivo	Pp	Neg	Neg	0	NA
28	M / 0,5	RCC	Vivo	Pp	Neg	Neg	0	0
29	M / 24	RCC	Vivo	Pp	Neg	Neg	0	0
Total				CPC (n=8) Pp (n=7)			CPC (n=12) Pp (n=7)	CPC (n=2) Pp (n=3)
Taxa de Sobrevida**			CPC = 2/8 (25%) Pp = 4/6 (66,6%)					

QUADRO 5 - SOBREVIDA E HISTÓRICO DE CÂNCER EM FAMÍLIAS COM CASOS DE CPC OU Pp NEGATIVOS PARA A MUTAÇÃO R337H

FONTE: A autora (2011)

NOTA – RCC: Remoção Cirúrgica Completa. Qt: Quimioterapia. *Lado da família com maior número de casos de câncer.** > 5 anos sem doença.

A taxa de sobrevida (>5 anos livre de doença) para o Grupo 1 não foi estatisticamente diferente do Grupo 2 (pacientes com CPC sem a mutação, 22%) e nem do Grupo 3 (pacientes com Pp sem a mutação, 66,6%) devido ao pequeno número de casos em cada grupo ($\text{Chi}^2 = 2,47549$ $\text{df} = 2$ $p = 0,29005$).

Os dados obtidos para a avaliação de casos de CPC em crianças do Estado do Paraná foram recentemente publicados em artigo intitulado *“Increased incidence of choroid plexus carcinoma due to the germline TP53 R337H mutation in southern Brazil.”*

O total aproximado de testes realizados para a detecção da mutação R337H neste estudo, considerando o teste em RN de maternidades, familiares e pacientes com diagnóstico de tumor cerebral do estudo de BLEGGI-TORRES (2004) foi de 189.459 (QUADRO 6).

Descrição	Total de testes realizados
Número de testes realizados em RN até março/2010	171.649
Número de testes realizados em familiares dos RN positivos para a mutação até março/2010.	2.612
Número de testes realizados para avaliação dos 29 casos de tumores cerebrais, crianças e familiares testados para a mutação	198
Número aproximado de testes realizados devido a falhas de amplificação das amostras, controles de qualidade* e confirmações.	15.000
TOTAL aproximado de testes realizados neste projeto	189.459

QUADRO 6 - NÚMERO APROXIMADO DE TESTES REALIZADOS PARA A PESQUISA DA MUTAÇÃO R337H TP53 NO ESTADO DO PARANÁ

FONTE: A autora (2011).

NOTA - * O grande número de testes para controle de qualidade foi necessário para reavaliação dos resultados obtidos nos ensaios realizados com três amostras simultaneamente.

6 DISCUSSÃO

Neste estudo foi possível demonstrar a viabilidade de um teste de DNA utilizando sangue periférico de RN para o rastreamento da mutação no gene *TP53* no Paraná (CUSTODIO *et al.*, 2011b). Foram previamente revisadas as situações que poderiam levar a um resultado falso-positivo ou falso-negativo para o teste que identifica a presença da mutação R337H no *TP53*, e por isso foi reforçado o controle de qualidade com repetições de exames na presença de qualquer tipo de dúvida no resultado inicial. Mesmo com todo cuidado, e com base em eventualidades de erros, o texto dos TCLE prevê e alerta aos participantes sobre o risco de erros em probabilidade muito pequena, mas não impossível de acontecer.

As amostras de sangue foram coletadas e identificadas pelas equipes das maternidades participantes do projeto. Em qualquer processo analítico, várias são as causas que podem gerar resultados falso-positivos ou falso-negativos, como erros de identificação, armazenamento e transporte inadequado das amostras coletadas, problemas técnicos que possam interferir na metodologia analítica, erros de digitação no resultado a ser divulgado e outros fatores. Qualquer uma dessas situações pode comprometer todo o processo analítico e gerar um resultado falso-positivo ou falso-negativo a ser divulgado para a família do RN.

Cada resultado positivo para a mutação foi testado por pelo menos três vezes antes de ser divulgado à família, o que minimizou qualquer interferência técnica neste processo analítico e, conseqüentemente, reduziu muito a probabilidade de um resultado falso-positivo. Um resultado falso-negativo pode acontecer, com uma probabilidade maior do que um resultado falso-positivo e, como nos demais tipos de triagem neonatal, é uma situação que pode ser bastante remota quando são adotadas medidas preventivas para se reduzir os riscos de falhas nos ensaios.

Uma grande vantagem do teste empregado neste estudo é a utilização de uma quantidade muito pequena de DNA em relação aos demais tipos de testes de triagem neonatal, além de não limitar o tempo decorrido entre a coleta e a realização do ensaio. Na análise de DNA do indivíduo, este tempo pode ser de vários meses sem haver comprometimento do teste. Um resultado falso-negativo para a mutação em um RN, que posteriormente venha a desenvolver o TCA, é uma situação mais remota, pois a grande maioria dos RN são negativos para a mutação e mais de 90%

dos portadores da mutação não desenvolvem o TCA. Felizmente, essa situação não foi registrada até o presente. Entretanto, foi surpreendente que dois RN submetidos ao teste na maternidade, com resultados comprovadamente negativos para a mutação R337H, desenvolveram o TCA, quando o esperado seria diagnosticar, no máximo, um caso para o total de mais de 171.649 RN testados. Estes dois casos corresponderam a uma incidência estimada de 3,9 casos / ano por milhão de crianças abaixo de 5 anos de idade, o que é muito maior que 0,4 casos / ano por milhão de crianças no mundo (PARKIN *et al.*, 1988; PIANOVSKI *et al.*, 2006a). Novas avaliações serão necessárias para esclarecer se este evento ocorreu por acaso ou se ele é representativo da população do Paraná.

A análise de amostras em forma de *pool* possibilitou uma redução de custos e de tempo, sem afetar a qualidade do ensaio. O ensaio para a detecção da mutação R337H na forma de *pool* de três amostras foi utilizado na avaliação de 135.000 amostras. Os ensaios utilizando amostras individuais (PCR utilizando somente dois discos de cada amostra de sangue) foram realizados para avaliação das 39.261 amostras restantes. As frequências da mutação obtidas pela utilização de ambos os ensaios foram semelhantes, e na média geral, foi de 1 caso para cada 371 RN vivos. Além disso, o teste com uma amostra individual de RN foi utilizado para confirmação de uma mutação sempre que o resultado de um ensaio em forma de *pool* fosse positivo para mutação, ou quando houve problemas de amplificação nos ensaios em forma de *pool*, ou quando os discos com sangue dos RN eram resistentes ao clareamento pela utilização da solução de lavagem do papel filtro.

O aparecimento de um caso de TCA pediátrico no Paraná é indicativo da existência da mutação R337H *TP53* herdada de um dos pais. Até agora, todos os estudos que avaliaram um número expressivo de crianças com a mutação e (ou) que excluíram famílias de fora da região onde o TCA está associado com esta mutação (Paraná, São Paulo e Sul de Minas Gerais) chegaram a uma mesma conclusão: mais de 95% das crianças que desenvolvem TCA são positivas para a mutação R337H *TP53* no Estado do Paraná (RIBEIRO *et al.*, 2001; PIANOVSKI *et al.*, 2006a) e em mais de 70 casos admitidos no Centro Boldrini de Campinas, São Paulo (SEIDINGER *et al.*, 2011). As divergências de valores percentuais encontrados em outro estudo (LATRONICO *et al.*, 2001) são provavelmente decorrentes da inclusão de casos de famílias que não eram de São Paulo em gerações anteriores e (ou) de casos com idade mais avançada, entre 5 e 15 anos de idade. Outras explicações

menos prováveis seriam a diferença na metodologia utilizada e o pequeno tamanho da amostragem (LATRONICO *et al.*, 2001). Em concordância com a hipótese de que quanto maior a idade da criança menor a frequência do TCA, neste estudo foram encontradas 48 crianças portadoras da mutação R337H *TP53* e que desenvolveram o TCA e somente três adultos também portadores da mesma mutação com diagnóstico de TCA. Isso demonstra que, apesar de a mutação ser muito frequente no Paraná e São Paulo, ela não contribui significativamente para o aumento da incidência do TCA em adultos destes dois Estados.

A substituição da guanina pela adenina no códon 337 elimina o ponto de reconhecimento da enzima de restrição *HhaI* no gene *TP53*; diante deste fato, foi possível utilizar um teste sensível, específico e acessível de RFLP para identificar esta mutação em ambiente acadêmico, a um custo de apenas R\$ 3,50 / teste, incluindo todas as despesas associadas (transporte por SEDEX, material impresso, bolsa-auxílio para estudantes etc.). Para a implantação definitiva de uma rotina de detecção da mutação por entidades como a Fundação Ecumênica de Proteção ao Excepcional, este valor deverá ser superior, pois o custo de R\$ 3,50 / teste não contempla a remuneração dos recursos humanos necessários para a realização do rastreamento em massa no Estado do Paraná. Nessa condição, o custo estimado seria de aproximadamente R\$ 8,50 a R\$10,00 / teste. Com treinamento e supervisão adequados (para todas as regionais de saúde do Paraná), o TCLE, contendo a membrana apropriada para a coleta do sangue dos RN, foi oferecido para todas as maternidades do Estado do Paraná, totalizando 180.000 TCLE distribuídos para as maternidades que aceitaram fazer o teste. As regiões nas quais os casos de TCA estão associados com a mutação R337H no gene *TP53* são o sul de Minas Gerais e São Paulo (SEIDINGER *et al.*, 2011) e todo o Estado do Paraná, totalizando aproximadamente 55 a 60 milhões de habitantes. Deste total, estima-se que devam existir 3,5 milhões de crianças menores de cinco anos de idade. Embora a média da frequência da mutação R337H na população do sul de Minas Gerais e São Paulo não seja conhecida, acredita-se que esta mutação tenha uma frequência comparável à do Estado do Paraná.

Neste estudo foi demonstrado que o protocolo de vigilância ambulatorial, para detectar precocemente sinais e sintomas do TCA em crianças que herdaram um alelo com a mutação R337H, é suficientemente precoce e possibilita uma intervenção cirúrgica adequada e altamente eficiente. Todas as oito crianças com

TCA que foram diagnosticadas precocemente pelo protocolo de vigilância adotado neste estudo apresentaram tumores muito pequenos (mediana = 33 cm³). Além disso, essas crianças não necessitaram de terapia adjuvante (quimioterápicos e mitotano) após a cirurgia. Estudos anteriores demonstraram que crianças com TCA pequenos tiveram um excelente prognóstico quando tratadas somente com a cirurgia (MICHALKIEWICZ *et al.*, 1997). Reciprocamente, as 11 crianças com diagnóstico de TCA e que não participaram do protocolo de vigilância ambulatorial foram diagnosticadas com tumores muito maiores (mediana = 150 cm³) e com prognósticos piores. Duas destas crianças apresentaram recidivas e outra foi a óbito por complicações da quimioterapia. Outras cinco estão em tratamento intensivo com quimioterapia adjuvante e ainda possuem risco aumentado de morte, decorrente da medicação utilizada e das complicações posteriores associadas com a terapia.

Foi possível verificar que este protocolo de vigilância ambulatorial revelou casos de TCA com excelente prognóstico (tumores localizados, pesando de 1 a 45g). O mesmo resultado não foi obtido nos estudos para o diagnóstico precoce do neuroblastoma por meio da dosagem de catecolaminas urinárias, os quais avaliaram este parâmetro laboratorial em RN aos 6 e aos 12 meses de idade (SCHQUILLING *et al.*, 2002; SODERSTROM *et al.*, 2005). No rastreamento neonatal para o diagnóstico precoce do neuroblastoma, os RN não foram previamente selecionados por meio de um teste de risco para esta doença, haja vista a inexistência de um marcador para risco específico para o neuroblastoma. Em seguida, os RN não receberam um acompanhamento ambulatorial contínuo e a triagem neonatal ficou restrita à avaliação dos RN somente aos 6 e 12 meses de idade. Considerando estas questões, podem ser identificados dois problemas no rastreamento neonatal para o neuroblastoma: o número de casos foi superestimado, pois muitos dos casos revelados eram de comportamento benigno, e, além disso, os casos mais agressivos de neuroblastoma não foram detectados, pois as manifestações clínicas e achados laboratoriais se iniciaram somente após os 12 meses de idade. Para identificar os casos agressivos de neuroblastoma, seria necessário realizar mais exames, em várias faixas etárias, o que tornaria o rastreamento neonatal financeiramente inviável.

No rastreamento neonatal para a mutação R337H no Paraná, as crianças foram inicialmente selecionadas para o protocolo de vigilância ambulatorial porque eram portadoras da mutação que predispõe ao desenvolvimento do TCA e, na

sequência, foram monitoradas por meio de um marcador tumoral sensível (níveis de SDHEA, testosterona total e cortisol) associado com ultrassonografia e exame médico durante o período no qual este tumor normalmente ocorre (principalmente nos primeiros quatro anos de idade). É possível que outras alterações genéticas que aumentem a predisposição ao neuroblastoma e a outras doenças pediátricas embrionárias sejam descobertas e, desta forma, possibilitem o monitoramento de crianças pela utilização de marcadores mais específicos durante todo o período em que estas doenças normalmente se manifestam e que possibilitem o diagnóstico precoce e um tratamento eficaz.

Neste estudo, o número de casos de TCA diagnosticados em crianças que participaram ou não do protocolo de vigilância ambulatorial é igual, indicando que a detecção precoce não superestima o número de casos de TCA. Uma vez que os pais decidem se a criança participará ou não do protocolo de vigilância ambulatorial, o processo de seleção pode ser considerado randômico. Embora mais de 95% dos pais tenham aceitado participar do rastreamento neonatal, tornando este teste genético apropriado para a inclusão em um Programa de Triagem Neonatal Público, somente 62% dos pais de um RN positivo para a mutação aceitaram participar do protocolo de vigilância ambulatorial. Da mesma forma, somente 57 dos 238 parentes abaixo de 15 anos de idade, com resultado positivo para a mutação, participaram do mesmo protocolo para o diagnóstico precoce do TCA. A falta de participação no acompanhamento ambulatorial diminuiu substancialmente o propósito do rastreamento neonatal, ou seja, o diagnóstico e tratamento precoce de crianças com TCA. Em estudos anteriores de famílias que tiveram pelo menos um caso de TCA, a penetrância da mutação para o TCA em parentes até 19 anos foi de aproximadamente 10% (FIGUEIREDO *et al.*, 2006a), ao contrário do presente estudo que encontrou um valor próximo de 3% de penetrância e cujos portadores foram selecionados da população geral, ou seja, independentemente do histórico familiar de TCA pediátrico.

Os procedimentos adotados no programa de vigilância ambulatorial podem ser mais simples, sem que se tornem menos eficientes; por exemplo, a avaliação dos hormônios adrenocorticais pode ficar limitada à dosagem do SDHEA, haja vista que a maioria dos TCA associados à mutação R337H secreta andrógenos. Esta determinação de SDHEA deveria ser realizada em laboratórios de referência para evitar resultados falso-positivos, levando à investigação desnecessária, o que pode

acontecer devido às diferenças de sensibilidade e especificidade nos imunoensaios comerciais disponíveis para a dosagem do SDHEA e que podem gerar resultados mais elevados, dependendo da metodologia analítica. Considerando-se que os casos de TCA associados à mutação R337H ocorrem mais comumente antes de quatro anos de idade, o intervalo entre as consultas médicas poderia ser ajustado de acordo com esta faixa etária, como foi proposto neste estudo. Foi possível detectar tumores muito pequenos (igual ou abaixo de 45g), antes do aparecimento dos sinais e sintomas clínicos. Já era esperado que os tumores muito pequenos apresentassem um prognóstico muito melhor. Embora os dados do Registro Internacional de Tumor Adrenocortical Pediátrico, que avaliou 254 casos de TCA de diversas partes do mundo, tenham considerado os tumores abaixo de 200g como sendo de estadio I, este estudo mostrou que ainda havia aproximadamente 10% de óbitos para este estadio (MICHALKIEWICZ *et al.*, 2004). Uma estratificação mais detalhada dos tamanhos dos tumores do estadio I (dados não mostrados na publicação) revelou que quase todos os tumores muito pequenos não apresentaram recidiva. A identificação destes tumores pequenos foi possível por meio de avaliações de concentração plasmática de SDHEA e de imagens, sendo o SDHEA um marcador mais sensível e de menor custo do que a ultrassonografia abdominal.

Os riscos de os portadores da mutação R337H *TP53* desenvolverem um tipo de câncer diferente do TCA pediátrico ainda não foram completamente elucidados. Baseando-se no histórico familiar de câncer de participantes deste estudo, os quais foram identificados a partir de um RN com a mutação R337H, o lado da família que segrega a mutação tem 3,5 vezes mais casos de câncer do que o lado sem a mutação (541 vs. 157 casos). O número médio de casos de câncer por família no lado que segrega a mutação R337H foi 1,5. Estes resultados são consistentes com estudos prévios nos quais o número médio era de 2,3 casos de câncer por família segregando a mutação R337H. O maior número de casos de TCA no estudo anterior pode ser devido ao fato que as famílias foram selecionadas pela existência de pelo menos um probando com TCA (FIGUEIREDO *et al.*, 2006a). Independente da forma como as famílias com a mutação R337H foram selecionadas, o número médio de casos de câncer é mais baixo do que o descrito em famílias que segregam outros tipos de mutações no *TP53* (variando de 4,8 a 5,2 casos por família) (KLEIHUES *et al.*, 1997; BIRCH *et al.*, 2001; RUIJS *et al.*, 2010).

De estudos prévios sobre a mutação R337H no Sudeste e Sul do Brasil, TCA (LATRONICO *et al.*, 2001; RIBEIRO *et al.*, 2001) e CPC (CUSTODIO *et al.*, 2011a; SEIDINGER *et al.*, 2011) representam a maioria dos casos de câncer que ocorrem em crianças abaixo de 15 anos de idade. Câncer de mama, cérebro e estômago são os tipos mais comuns em outras faixas etárias. Por isso, o perfil de casos de câncer associado com famílias que segregam a mutação R337H é muito diferente daqueles reportados para mutações no gene *TP53* associadas com famílias de síndrome de Li-Fraumeni, particularmente no grupo pediátrico. No estudo de BIRCH *et al.* (2001) de 28 famílias segregando qualquer tipo de mutação no gene *TP53*, sarcomas de tecidos moles e ósseos correspondem a 31% dos casos, TCA 21% e tumores de cérebro 14% de todos os tumores observados em crianças abaixo de 15 anos de idade. Em um estudo recente que incluiu 24 famílias segregando diferentes mutações no *TP53*, sarcomas ósseos ou de tecidos moles representaram 47% dos casos, tumores cerebrais 32% e TCA 5,2% das crianças abaixo de 15 anos de idade (RUIJS *et al.*, 2010). Por outro lado, entre as famílias encontradas neste estudo que segregam a mutação R337H, nenhum caso de tumor de tecidos moles ou sarcomas ósseos foi encontrado em crianças abaixo de 15 anos de idade e o TCA correspondeu a 84% de todos os tumores neste grupo, seguido pelos tumores de cérebro (11,5%). Essas observações corroboram com a sugestão de que os mecanismos envolvidos na predisposição ao câncer para diferentes mutações no gene *TP53* podem depender de fatores teciduais específicos (KLEIHUES *et al.*, 1997).

Na glândula adrenal, a mutação R337H aparenta seguir o modelo clássico de formação de tumores proposto por KNUDSON (1985), no qual a presença de um alelo mutado na primeira etapa da tumorigênese e subseqüentes mudanças genéticas, resultam na perda somática do alelo selvagem. Isso é justificado pela presença da LOH no tecido tumoral de quase todos os casos de TCA associados com a mutação R337H. Além disso, este conceito é consistente com a observação de que as três crianças deste estudo que herdaram o alelo R337H de ambos os seus pais, sendo, portanto, homozigotas para a mutação R337H *TP53*, desenvolveram TCA (2 casos) ou CPC (um caso), com histologia bastante agressiva. Entre os achados histológicos descritos para os TCA de crianças homozigotas para a mutação R337H, foi verificado um grande número de células em processo de divisão, invadindo a cápsula do tumor e vasos sanguíneos, além de

achados “in vitro” e “in vivo” de crescimento muito rápido destes TCA. No caso do CPC de uma criança também homozigota para R337H, os achados histológicos foram semelhantes, mas serão reavaliados com maior detalhamento, incluindo-se vários marcadores de prognóstico por meio da técnica de IQ. Nos casos de osteossarcoma, CPC e câncer de mama em indivíduos portadores da mutação R337H, não foi encontrada LOH no tecido tumoral de maneira uniforme, sugerindo um mecanismo alternativo da mutação R337H nestes tecidos (ASSUMPÇÃO *et al.*, 2008; CUSTODIO *et al.*, 2011a; SEIDINGER *et al.*, 2011).

A frequência da mutação germinativa R337H em crianças com TCA é maior que 95% no Estado do Paraná, enquanto é de somente 3% em mulheres jovens com câncer de mama e de 7% em adolescentes com osteossarcoma (ASSUMPÇÃO *et al.*, 2008; SEIDINGER *et al.*, 2011). Entretanto, estudos adicionais são necessários para se determinar o risco para o desenvolvimento de outros tipos de câncer em portadores da mutação R337H (adultos e crianças) e investigar fatores constitucionais e (ou) ambientais que possam contribuir com a tumorigênese. No decorrer deste estudo foram encontrados outros tipos de tumores em crianças portadoras da mutação R337H, revelando que as informações sobre o risco de desenvolvimento de outros tipos de câncer em crianças ainda são insuficientes. Tais informações têm implicações importantes para o aconselhamento genético e rastreamento pré-sintomático de pacientes com mutações no gene *TP53* (ZAMBETTI, 2007).

O presente estudo utilizou um teste de DNA para selecionar as crianças menores de 5 anos de idade para um protocolo de vigilância que estabeleceu os melhores indicadores de seguimento ambulatorial para a detecção precoce do TCA pediátrico. Esse foi o objetivo principal deste estudo, considerando que o TCA tem uma elevada taxa de mortalidade (MICHALKIEWICZ *et al.*, 2004). Os resultados sugerem fortemente que esse teste de DNA deve ser incluído no atual Programa de Triagem Neonatal do Estado do Paraná, além de sugerir um protocolo igual ou semelhante para o acompanhamento ambulatorial de crianças provenientes de regiões com alta prevalência da mutação R337H, visando ao diagnóstico precoce do TCA pediátrico. Em primeiro lugar, o ensaio para a detecção da mutação R337H *TP53* é específico para esta mutação e viável para ser implantado em um rastreamento em massa. Em segundo lugar, o custo do rastreamento é baixo e pode ser facilmente absorvido pelo sistema público de saúde do Paraná e parte do

Sudeste do Brasil, podendo ser oferecido gratuitamente a todos os RN e familiares portadores da mutação. Em terceiro lugar, o protocolo de acompanhamento ambulatorial é eficiente para a detecção de sinais precoces da doença e o custo deveria ser absorvido pelo município da residência de cada criança com a mutação. Finalmente, a intervenção cirúrgica está associada com taxas de cura maiores que 90% quando a doença é detectada nos estádios iniciais. O protocolo ambulatorial é bastante intenso e relativamente caro quando se considera que somente cerca de 3% das crianças portadoras da mutação R337H irão desenvolver o TCA ou outros tumores. Entretanto, a detecção da mutação R337H em um RN traz diversas vantagens para a família, como orientações sobre o risco de desenvolvimento de outros tipos de câncer em adultos avaliados em todas as gerações destas famílias, assim como as implicações psicossociais, culturais, econômicas e de saúde para os indivíduos que segregam a mutação.

As razões para os parentes abandonarem ou se recusarem a participar do protocolo de vigilância ambulatorial foram multifatoriais, incluindo razões sócioeconômicas, culturais, religiosas e, sobretudo a descrença sobre o aparecimento do TCA em mais de 1/3 das famílias que nunca tiveram nenhum caso de câncer. Até que essas razões sejam esclarecidas e seja possível desenvolver medidas educativas mais frequentes para aumentar a participação dos parentes no protocolo de vigilância ambulatorial, outros métodos alternativos de acompanhamento dos portadores da mutação R337H podem ser desenvolvidos para assegurar o diagnóstico precoce e o tratamento do TCA. Neste contexto, podem ser citados como exemplos a orientação aos médicos e a outros profissionais da saúde para os sinais e sintomas da doença e o contato periódico com os pais e familiares das crianças por telefone ou email com objetivo de questionamento sobre a situação de saúde das suas crianças. Em adição, programas educacionais (para o público e para médicos não especialistas) podem ser desenvolvidos para reduzir o estigma e o medo associados com esta predisposição genética herdada ao câncer.

Esses desafios não são exclusivos da mutação R337H herdada. O rastreamento neonatal para anemia falciforme, que é obrigatório nos EUA, identifica os RN homozigotos para iniciar um tratamento profilático com penicilina em centros médicos especializados. Essa estratégia diminui a mortalidade associada com infecções e outras complicações. Além disso, as famílias são inscritas em um programa de cuidados integrais que inclui uma parceria entre serviços prestadores

de cuidados primários e centros médicos acadêmicos para dar suporte a estes indivíduos que terão necessidades especiais por toda a vida (US PREVENTIVE SERVICES TASK FORCE, 2007). Finalmente, os fundos públicos são alocados para pesquisas básicas e clínicas com a finalidade de melhorar a assistência a estes pacientes. Os resultados do Programa da Anemia Falciforme nos EUA, assim como os resultados deste estudo, compartilham de um modelo que traduz conhecimento laboratorial básico e observações epidemiológicas no atendimento clínico e na adaptação de técnicas genéticas utilizadas no setor público de regiões com recursos limitados.

Considerando a pequena série de CPC deste estudo, não foi possível estimar a incidência deste tumor em crianças no Estado do Paraná. Contudo, como havia sido verificado por BLEGGI-TORRES *et al.* (2004), o presente estudo demonstrou um aumento na incidência de CPC devido à alta frequência da mutação R337H *TP53*. Os resultados deste estudo indicam que a mutação R337H pode contribuir para o desenvolvimento de pelo menos 63,6% dos casos de CPC do Paraná. Vale destacar que SEIDINGER *et al.* (2011) examinaram a frequência de R337H em muitos tipos de câncer pediátrico, incluindo 70 casos de TCA e 13 casos de CPC e também encontraram 65% dos casos de CPC (9/13) com a mutação germinativa R337H. Embora nenhuma das famílias tenha sido classificada como SLF nesta pequena casuística de CPC (n=22, dos quais apenas duas faziam parte das famílias recrutadas por meio da triagem neonatal para R337H), não se pode descartar a possibilidade de existência de outras mutações de baixa penetrância no *TP53*. De acordo com AGUZZI; BRANDNER; PAULUS (2000), o CPC afeta mais meninos do que meninas (na razão de 3:1), o que é consistente com a presente série de casos (15 meninos e 7 meninas). Na descrição original de BLEGGI-TORRES *et al.* (2004), o CPC representava 63,1% de todos os tumores de plexo coróide do Paraná, em contraste com 8,1% (CHOW *et al.*, 1999) e 16,6% (AGUZZI; BRANDNER; PAULUS, 2000). Esta proporção aumentada dos casos de CPC encontrada nos pacientes atendidos em hospitais de Curitiba teve como hipótese uma relação com um patógeno desconhecido (BLEGGI-TORRES *et al.*, 2004). A casuística de CPC neste estudo e casos de Pp incluíram apenas os casos do Hospital Pequeno Príncipe (cerca de 80% do total de casos reportados por BLEGGI-TORRES *et al.*, 2004). De acordo com esta hipótese, o número muito aumentado de CPC positivos para a mutação germinativa (63,6%) no presente estudo poderia

explicar este aumento de incidência do CPC no Paraná. O padrão hemizigoto com o haplótipo R337H, após a perda do alelo selvagem do *TP53* encontrado em 4/14 casos de CPC, reforça a ideia de que a proteína R337H é defeituosa e pode, sob certas condições metabólicas, perder sua atividade protetora contra a formação do câncer (DIGIAMMARINO *et al.*, 2002).

Outro fato marcante, a permanência do alelo selvagem na maioria dos CPC (9/13), incluindo a perda do alelo R337H (n=2), desafia a suposição geral de que a atividade supressora tumoral do *TP53* deve estar inativada neste tipo de tumor. Uma situação similar foi anteriormente reportada no câncer de mama, com a perda do alelo selvagem associado a outras alterações do gene *TP53* (ASSUMPÇÃO *et al.* 2008). Apesar de o tecido tumoral ter sido cuidadosamente dissecado, não se pode descartar a possibilidade de contaminação com tecido cerebral normal.

Considerando que a mutação R337H *TP53* está presente em frequência similar em outros Estados do Sul do Brasil (revisado por PIANOVSKI *et al.*, 2006a), é provável que o número atual de casos de CPC em crianças, causados pela mutação R337H, seja maior que 0,3 / milhão/ ano como previamente reportado (BERGER *et al.*, 1998). A população total dos dois Estados (Paraná e São Paulo) é de aproximadamente 50 milhões de habitantes e inclui mais de 15 milhões de crianças abaixo de 15 anos de idade, o que representa um sério problema de saúde pública.

Em uma série de 31 famílias segregando a mutação germinativa R337H com 41 casos de TCA, nenhuma delas apresentou casos de CPC (FIGUEIREDO *et al.*, 2006a). Esse fato é consistente com uma penetrância muito mais baixa da mutação R337H para o CPC em comparação com o TCA em crianças. Além disso, nesse estudo (FIGUEIREDO *et al.*, 2006a) foi encontrado somente 22,5% de famílias (7/31) que apresentaram quatro ou mais casos de câncer no lado da família que segrega a mutação. Em contraste, nesta casuística de 22 casos de CPC do presente estudo, as famílias que carregam a mutação R337H são mais frequentemente associadas com outros tipos de tumores, sendo que 71,4% (10/14) delas apresentaram quatro ou mais casos de câncer. Essa diferença abre uma possibilidade para a hipótese de que o CPC está mais presente nas famílias com maior número de casos de câncer. Além da baixa penetrância para o CPC (baseado no baixo número de casos de câncer), pode-se hipotetizar que esta associação entre CPC e outros casos de câncer reflete um perfil genético diferente. De forma interessante, todos os pacientes

do QUADRO 5 do estudo de CUSTODIO *et al.* (2011a) sem casos de câncer nas famílias estão vivos, o que é consistente com CPC ou Pp esporádicos.

Pode haver algumas dificuldades no diagnóstico do CPC devido às características morfológicas similares àquelas de outras entidades em rotina de microscopia, tornando essencial encontrar marcadores biológicos para caracterizar estes tumores. O diagnóstico diferencial deve ser feito em comparação com outros tumores neuroectodérmicos, tais como ependimomas, carcinomas papilares metastáticos (incomum em crianças), carcinomas embrionários, meningiomas anaplásticos, glioblastomas e adenomas pituitários, entre outros (ANG *et al.*, 1990; LOUIS *et al.*, 2007).

Os mecanismos envolvidos na formação do CPC não estão claros e os casos reportados são escassos. Estudos prévios sugerem que a inativação do gene hSNF5/INI-1 pode exercer um papel especial no mecanismo de desenvolvimento do CPC (GESSI; GIANGASPERO; PIETSCH, 2003). Além disso, recentemente foi reportado que a perda da função do *TP53* parece ser a causa mais prevalente deste tumor (TABORI *et al.*, 2010). Esses autores encontraram uma mutação germinativa no *TP53* em 50% dos casos (32/64). Eles também encontraram duas sequências conhecidas por conferirem disfunção ao *TP53*, a saber, *TP53* codon72 e *MDM2* SNP309, coexistindo na maioria dos CPC com alelo selvagem do *TP53* (92%) e não nos CPC com alelo mutado do *TP53*, o que sugere um mecanismo complementar da disfunção do *TP53* na ausência de mutação neste gene. O CPC tem sido também associado com o Vírus Simian 40 (SV40), um poliomavírus de primatas potencialmente oncogênico em roedores e suas sequências de DNA foram encontradas em 50% dos casos de CPC em crianças (BERGSAGEL *et al.*, 1992). Ressalta-se que, as proteínas virais do DNA do tumor, incluindo SV40, Papiloma Vírus Humano E6 (HPV E6) e proteína do adenovírus E1B-55k, inativam o p53 via interação proteína-proteína de alta afinidade (LEVINE, 2009). Além disso, foi recentemente reportado outro mecanismo epigenético de inativação do p53 mediado por proteínas virais que silenciam a transcrição do p53 ativado, independentemente da fosforilação e estabilização do p53 (SORIA *et al.*, 2010). Esses autores citados demonstraram que a proteína do adenovírus, E4-ORF3, pode marcar os promotores de p53 como parte de um programa de silenciamento transcricional antiviral, sem colocalização com o p53. Essas proteínas virais são importantes candidatas para uma investigação futura em todos os casos de CPC e Pp.

O tratamento de escolha para o CPC é a cirurgia de ressecção do tumor, considerado um procedimento potencialmente curativo que pode conferir até 50% de sobrevida em uma série com os melhores resultados (McEVOY *et al.*, 2000). A radioterapia tem sido recomendada para reduzir o tamanho do tumor antes da cirurgia e para controlar os casos de doença invasiva localizada, disseminada ou recorrente (BERGER *et al.*, 1998). Em nossa presente casuística (22 casos de CPC), cinco pacientes foram submetidos ao tratamento com radioterapia e somente três sobreviveram (dois casos negativos e um caso positivo para a mutação R337H). A quimioterapia é apresentada como uma ferramenta para ser associada ao tratamento cirúrgico. Não há, contudo, um consenso sobre a quimioterapia de escolha devido à dificuldade para definir protocolos para um tipo de tumor tão raro (PIERGA *et al.*, 1993).

Foi demonstrado que, para pacientes com CPC apresentando baixa variação estrutural total (TSV) e ausência de disfunção do *TP53*, há um prognóstico favorável e pode ser tratado com sucesso sem a utilização da radioterapia (TABORI *et al.*, 2010). Pelo contrário, estes autores mostraram que altas TSV foram associadas com risco significativo de progressão tumoral e que taxas de sobrevida de cinco anos para pacientes com CPC *TP53* imunopositivos e imunonegativos eram de 0% e 82%, respectivamente. Eles também demonstraram que 14 de 16 pacientes com CPC retendo o alelo selvagem do *TP53* estão vivos sem terem recebido radioterapia. A taxa de sobrevida (> 5 anos livre de doença) no presente estudo foi de 18,1% (2/11) para CPC positivo para R337H (QUADRO 4) e 25% para CPC negativo para R337H (QUADRO 5). Esta taxa diminuída de sobrevida em CPC negativo para R337H, em contraste com a série do Canadá (82%), pode ser devido a outras mutações no *TP53* que possam existir entre os CPC deste estudo ou a diferenças nos protocolos de tratamento ou a atrasos no diagnóstico do tumor.

O aumento da incidência do CPC no Paraná (CUSTODIO *et al.*, 2011a) e provavelmente em São Paulo (SEIDINGER *et al.*, 2011), ambos com a mesma proporção da mutação R337H em casos de CPC (63-65%), também é observada para os casos de TCA (93-95%) nos dois Estados (RIBEIRO *et al.*, 2001); SEIDINGER *et al.*, 2011). Entretanto, estudos adicionais são necessários para entender a diferença da penetrância da mutação R337H para TCA e CPC e para verificar se existe alguma relação com outros genes e (ou) fatores ambientais.

É relativamente difícil uma célula sofrer o segundo *hit*, ou seja, a perda do alelo normal do *TP53*. No entanto, considerando-se um córtex adrenal fetal em desenvolvimento, nos últimos meses da gestação e após o nascimento, há um processo fisiológico intenso de morte celular programada, podendo levar uma célula da zona fetal a sofrer o segundo *hit* e a LOH. No entanto, esse evento não é suficiente para o surgimento do TCA. No presente estudo foram encontrados 48 casos de TCA em crianças e apenas três casos de TCA em adultos (16:1), o que demonstra que esta diferença ocorre devido à suscetibilidade da zona fetal do córtex adrenal em desenvolvimento. Esta suscetibilidade também foi demonstrada para outras mutações de baixa penetrância no gene *TP53* (VARLEY *et al.*, 1999), os quais verificaram que duas destas mutações (códon 152 e 158), ambas localizadas no domínio de ligação ao DNA, não estavam relacionadas com SLF e nem, tampouco, com famílias com outros tipos de histórico de câncer, porém foram encontradas como mutações germinativas em crianças que desenvolveram TCA (22 de 25 crianças). O que estes dados sugerem é que, apesar da baixa penetrância do R337H *TP53* e das mutações nos códon 152 e 158, existe uma condição de maior sensibilidade do córtex adrenal em desenvolvimento, levando à formação do TCA com maior frequência, diferentemente de outros tecidos.

Conforme reportado em trabalho anterior (PIOVEZAN, 2006), foi estimado que o número aproximado de pessoas heterozigóticas para a mutação R337H no Paraná é de 41.000 indivíduos. Para efeito de cálculo incluindo o Estado de São Paulo, o número de pessoas com a mutação R337H seria seis vezes maior. Destas, a atenção deve ser voltada para as crianças com menos de cinco anos de idade.

Este projeto foi necessário para se avaliar e esclarecer algumas dúvidas em relação à frequência e às implicações sobre esta mutação na população do Estado do Paraná. Em cada 371 RN vivos, um é portador desta mutação, que também foi confirmada em todos os pais examinados. Este trabalho não foi um compromisso apenas com a parte médica, mas foi, fundamentalmente, um exemplo de trabalho em equipe de um exército de coautores e colaboradores anônimos que se articularam para obter informações e realizar tarefas que envolveram 171.649 RN e um grande número de parentes de 461 RN portadores da mutação R337H. Foi também um exemplo de superação de custos, pois foi possível inovar o exame de DNA para ser incorporado ao PNTN da Fundação Ecumênica do Paraná a um custo baixo e acessível.

Diante dos resultados obtidos para as crianças que foram beneficiadas com o diagnóstico precoce do TCA, é possível reafirmar a importância do rastreamento neonatal para a identificação das crianças portadoras da mutação R337H *TP53* no Paraná, haja vista o elevado número de casos de TCA neste Estado. Além disso, incluir estas crianças portadoras da mutação em um programa de vigilância ambulatorial possibilita o diagnóstico precoce e a cura em mais de 90% dos casos.

A tentativa de acompanhamento de toda a população pediátrica do Estado do Paraná visando o diagnóstico precoce do TCA, considerando-se o cenário atual da saúde pública em nosso Estado, teria um elevado custo, sem a garantia de resultados semelhantes aos obtidos por meio da triagem neonatal. Medidas alternativas como a implantação de programas educacionais sobre os sinais e sintomas do TCA a serem divulgadas para todos os profissionais de saúde do Estado são importantes e devem ser realizadas, mas não representam uma solução tão eficiente como a triagem neonatal seguida de um protocolo de vigilância ambulatorial para os RN identificados com a mutação R337H.

7 CONCLUSÕES

Foi possível implantar o rastreamento neonatal em todo o Estado do Paraná e avaliar os RN para a presença da mutação R337H no gene *TP53*, o que possibilitou o cálculo da prevalência geral desta mutação no Paraná, bem como para cada uma das 22 Regionais de Saúde e a prevalência média para o Estado.

Houve, sem dúvida, um grande benefício para os RN portadores da mutação que participaram do protocolo de vigilância ambulatorial, com o diagnóstico precoce do TCA e maior probabilidade de cura quando comparado ao grupo que não participou do protocolo de vigilância, cujos tumores foram diagnosticados em estádios mais avançados, necessitando de tratamento quimioterápico complementar à cirurgia de remoção do tumor.

A partir dos dados de desenvolvimento de TCA nos RN identificados no rastreamento neonatal, foi possível calcular a penetrância desta mutação para o TCA em crianças abaixo de 5 anos de idade (duração da coorte deste estudo). Da mesma forma, a incidência média anual do TCA em crianças abaixo de 5 anos de idade e o número estimado de novos casos de TCA por ano também foram calculados para o Estado do Paraná.

Foi possível identificar que o segundo tipo de câncer mais comum entre as crianças portadoras da mutação R337H *TP53* é o carcinoma de plexo coróide. Observou-se que a perda do alelo selvagem do *TP53* acontece com menor frequência nos casos de CPC em contraste com os casos de TCA.

Foram identificados os tipos de câncer mais comuns em adultos portadores da mutação R337H *TP53* e, através do histórico de câncer destes indivíduos, foi possível classificar as famílias de acordo com diferentes critérios de câncer familiar.

REFERÊNCIAS

ACHATZ, M. I. *et al.* The *TP53* mutation, R337H, is associated with Li-Fraumeni and Li-Fraumeni-like syndromes in Brazilian families. **Cancer Lett.**, São Paulo, v. 245, n. 1-2, p. 96-102, 2007.

AGUZZI, A.; BRANDNER, S.; PAULUS, W. Choroid plexus tumors. In: KLEIHUES, P.; CAVENEE, W. (Ed). **Pathology and genetics - tumors of the nervous system**. Lyon: IARC Press, 2000. p. 84-86.

ALTEKRUSE, S. F. *et al.* SEER Cancer Statistics Review, 1975-2007. **National Cancer Institute**, Bethesda, 2009. Disponível em: <http://seer.cancer.gov/csr/1975_2007/>. Acesso em 20/05/2011.

ANG, L. C. *et al.* An immunohistochemical study of papillary tumours in the central nervous system. **Cancer**, Ontario, v. 65, n. 12, p. 2712-2719, 1990.

ASSUMPÇÃO, J. G. *et al.* Association of the germline *TP53* R337H mutation with breast cancer in southern Brazil. **BMC Cancer**, Campinas, v. 8, p. 357, 2008.

BEIGUELMAN, B. **Genética médica: dinâmica dos genes nas famílias e nas populações**. São Paulo: EDART, 1977. p.241

BERGER, C. *et al.* Choroid plexus carcinoma in childhood: clinical features and prognostic factors. **Neurosurgery**, Saint Etienne, v. 42, n. 3, p. 470-475, 1998.

BERGSAGEL, D. J. *et al.* DNA sequences similar to those of simian virus 40 in ependymomas and choroid plexus tumors in childhood. **N Engl J Med**, Boston, v. 326, n. 15, p. 988-993, 1992.

BERRUTI, A. *et al.* Mitotane associated with etoposide, doxorubicin, and cisplatin in the treatment of advanced adrenocortical carcinoma. Italian Group for the Study of Adrenal Cancer. **Cancer**, Torino, v. 83, n. 10, p.2194–2200, 1998.

BIRCH, J. M. Li-Fraumeni syndrome. **Eur J Cancer**, Manchester, v. 30A, n. 13, p. 1935-1941, 1994a.

BIRCH, J. M. Familial cancer syndromes and clusters. **Br Med Bull**, Manchester, v. 50, n. 3, p. 624-639, 1994b.

BIRCH, J. M. *et al.* Relative frequency and morphology of cancers in carriers of germline TP53 mutations. **Oncogene**, Manchester, v. 20, n. 34, p. 4621-4628, 2001.

BLEGGI-TORRES, L. F. *et al.* Tumores de Plexo Coroide. Estudo epidemiológico comparativo de 24 casos. **Arq Neuropsiquiatr**, Curitiba, v. 62, n. 1, p. 127-130, 2004.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Indicadores do Programa Nacional de Triagem Neonatal, 2007. Disponível em:
<http://portal.saude.gov.br/portal/saude/area.cfm?id_area=1061>. Acesso em 20/05/2011.

CHOMPRET, A. *et al.* Sensitivity and predictive value of criteria for p53 germline mutation screening. **J Med Genet**, Villejuif Cedex, v. 38, n. 1, p. 43-47, 2001.

CHOW, E. *et al.* Pediatric choroid plexus neoplasms. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, Memphis, v. 44, n. 2, p. 249-254, 1999.

CUSTODIO, G. *et al.* Increased Incidence of Choroid Plexus Carcinoma Due to the Germline TP53 R337H Mutation in Southern Brazil. **PLoS One**, Curitiba, v. 6, n. 3, p. e18015, 2011a.

CUSTODIO, G. *et al.* Neonatal Screening for the R337H TP53 Mutation and Surveillance for Early Diagnosis of Childhood Adrenocortical Tumors in the Paraná State, Brazil, 2011b. Em preparação.

DE VRIES, A. *et al.* Targeted point mutations of p53 lead to dominant-negative inhibition of wild-type p53 function. **Proc Natl.Acad.Sci.U.S.A**, Cambridge, v. 99, n. 5, p. 2948-2953, 2002.

DESANDES, E. *et al.* Cancer incidence among children in France, 1990-1999. **Pediatr Blood Cancer**, Vandoeuvre-lès-Nancy, v. 43, n. 7, p. 749-757, 2004.

DIGIAMMARINO, E.L. *et al.* A novel mechanism of tumorigenesis involving pH-dependent destabilization of a mutant p53 tetramer. **Nat Struct Biol**, Memphis, v. 9, n. 1, p. 12-16, 2002.

DOGHMAN, M. *et al.* Regulation of insulin-like growth factor-mammalian target of rapamycin signaling by microRNA in childhood adrenocortical tumors. **Cancer Res**, Valbonne, v. 70, n. 11, p. 4666-4675, 2010.

DONEHOWER, L. A. *et al.* Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. **Nature**, Houston, v. 356, n. 6366, p. 215-221, 1992.

EL-DEIRY, W. S. *et al.* Definition of a consensus binding site for p53. K. **Nat Genet**, Baltimore, v. 1, p. 45-49, 1992.

EVANS S. C.; LOZANO, G. The Li-Fraumeni syndrome: an inherited susceptibility to cancer. **Mol Med Today**, v. 3, n. 9, p. 390-395, 1997.

FARRUGIA, A.; KEYSER, C.; LUDES, B. Efficiency evaluation of a DNA extraction and purification protocol on archival formalin-fixed and paraffin-embedded tissue. **Forensic Sci Int**, Strasbourg, v. 194, n. 1-3, p. e25-28, 2010.

FIGUEIREDO, B. C. *et al.* Penetrance of adrenocortical tumours associated with the germline TP53 R337H mutation. **J Med Genet**, Curitiba, v. 43, n. 1, p. 91-96, 2006a.

FIGUEIREDO, B. C.; PIANOVSKI, M. A.; CUSTODIO, G. Tumorigênese do córtex adrenal. In: MONTE, O.; LONGHI, C. A.; CALLIARI, L. E.; KOCHI, C. (Ed.). **Endocrinologia para o pediatra**. São Paulo: Atheneu, 2006b. p. 941-953.

FIGUEIREDO, B. C. *et al.* Amplification of the steroidogenic factor 1 gene in childhood adrenocortical tumors. **J Clin Endocrinol Metab**, Curitiba, v. 90, n. 2, p. 615-619, 2005.

FIGUEIREDO, B. C. *et al.* (Ed.). **Tumores de córtex adrenal: fisiologia, clínica, epidemiologia, patologia, genética e tratamento**. São Paulo: Sonopress, 2004. 1 CD-ROM.

FIGUEIREDO, B. C. *et al.* Amplification of 9q34 in childhood adrenocortical tumors: a specific feature unrelated to ethnic origin or living conditions. **Braz J Med Biol Res**, Curitiba, v. 33, n. 10, p. 1217-1224, 2000.

FIGUEIREDO, B. C. *et al.* Comparative genomic hybridization analysis of adrenocortical tumors of childhood. **J Clin Endocrinol Metab**, Curitiba, v. 84, n. 3, p. 1116-1121, 1999.

FORD, D. *et al.* Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the *BRCA1* and *BRCA2* genes in breast cancer families. **Am J Hum Genet**, Sutton, v. 62, n. 3, p. 676-689, 1998.

FUNK, W. D. *et al.* A transcriptionally active DNA binding site for human p53 protein complexes. **Mol Cell Biol**, Dallas, v. 12, n. 6, p. 2866-2871, 1992.

GESSI, M.; GIANGASPERO, F.; PIETSCH, T. Atypical teratoid/Rhabdoid tumors and choroide plexus tumors: when genetics "surprise" pathology. **Brain Pathol**, Rome, v. 13, n. 3, p. 409-414, 2003.

HOEPFFNER, W. *et al.* Patients with classic congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency can achieve their target height: the Leipzig experience. **Horm Res**, Leipzig, v. 70, n. 1, p. 42-50, 2008.

HOLLSTEIN, M. *et al.* Somatic point mutations in the p53 gene of human tumors and cell lines: updated compilation. **Nucleic Acids Res**, Heidelberg, v. 24, n. 1, p. 141-146, 1996.

INSTITUTO DE PESQUISA PELÉ PEQUENO PRÍNCIPE. PESQUISAS. GEOMEDICINA. www.geomedicina.org.br; <http://geomedicina.pelepequenoprincipe.org.br> . Acesso em 20/06/11.

JACKS, T. *et al.* Tumor spectrum analysis in p53-mutant mice. **Curr Biol**, Cambridge, v. 4, n. 1, p. 1-7, 1994.

JEMAL, A. *et al.* Cancer statistics, 2003. **CA Cancer J Clin**, Atlanta, v. 53, n. 1, p. 5-26, 2003.

KALBFLEISCH, J. D.; PRENTICE, R. L. **The Statistical Analysis of Failure Time Data**. New York: 1980. 188 p.

KLEIHUES, P. *et al.* Tumors associated with p53 germline mutations. A synopsis of 91 families. **Am J Pathol**, Lyon, v. 150, n. 1, p. 1-13, 1997.

KNUDSON, A. G. Jr. Hereditary cancer, oncogenes, and antioncogenes. **Cancer Res**, Philadelphia, v. 45, n. 4, p. 1437-1443, 1985.

KNUDSON, A. G. Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. **Proc Natl Acad Sci U.S.A**, Houston, v. 68, n. 4, p. 820-823, 1971.

LATRONICO, A. C. *et al.* An inherited mutation outside the highly conserved DNA-binding domain of the p53 tumor suppressor protein in children and adults with sporadic adrenocortical tumors. **J Clin Endocrinol Metab**, São Paulo, v. 86, n. 10, p. 4970-4973, 2001.

LE ROITH, D.; BUTLER, A. A. Insulin-like growth factors in pediatric health and disease. **J Clin Endocrinol Metab**, Bethesda, v. 84, n. 12, p. 4355-4361, 1999.

LEVINE, A. J. . The common mechanisms of transformation by the small DNA tumor viruses: The inactivation of tumor suppressor gene products: p53. **Virology**, New Jersey, v. 384, n. 2, p. 285-293, 2009.

LEVINE, A. J. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. **Cell**, New Jersey, v. 88, n. 3, p. 323-331, 1997.

LEVINE, A. J. *et al.* The spectrum of mutations at the p53 locus. Evidence for tissue-specific mutagenesis, selection of mutant alleles, and a "gain of function" phenotype. **Ann N Y Acad Sci**, New Jersey, v. 768, p. 111-128, 1995.

LI, F. P. *et al.* A cancer family syndrome in twenty-four kindreds. **Cancer Research**, Bethesda, v. 48, n. 18, p. 5358-5362, 1988.

LIU, G. *et al.* High metastatic potential in mice inheriting a targeted p53 missense mutation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, Houston, v. 97, n. 8, p. 4174-4179, 2000.

LIVINGSTONE, L. R. *et al.* Altered cell cycle arrest and gene amplification potential accompany loss of wild-type p53. **Cell**, Chapel Hill, v. 70, n. 6, p. 923-935, 1992.

LOUIS, D. N. *et al.* The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. **Acta Neuropathol**, Boston, v. 114, n. 2, p. 97-109, 2007.

MALKIN, D. *et al.* Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. **Science**, Charlestown, v. 250, n. 4985, p. 1233-1238, 1990.

MARIGO, C.; MULLER, H.; DAVIES, J. N. P. Survey of cancer in children admitted to a Brazilian charity hospital. **J Natl Cancer Inst** , v. 43, n. 6, p. 1231-1240, 1969.

McCABE, L.L.; McCABE, E.R. Expanded newborn screening: implications for genomic medicine. **Annu Rev Med**, Los Angeles, v. 59, n. 1, p. 163-175, 2008.

McEVOY, A. W. *et al.* Management of choroid plexus tumours in children: 20 years experience at a single neurosurgical centre. **Pediatr Neurosurg**, London, v. 32, n. 4, p. 192-199, 2000.

McMANAMY, C. S. *et al.* Nodule formation and desmoplasia in Medulloblastomas – Defining the nodular/desmoplastic variant and its biological behavior. **Brain Pathol**, Newcastle, v. 17, n. 2, p. 151-164, 2007.

MELO, E. L. A. *et al.* Lesões expansivas do plexo coróide. **Radiol Bras**, São Paulo, v. 36, n. 6, p. 379-384, 2003.

MICHALKIEWICZ, E. *et al.* Clinical and outcome characteristics of children with adrenocortical tumors: a report from the International Pediatric Adrenocortical Tumor Registry. **J Clin Oncol**, Memphis, v. 22, n. 5, p. 838-845, 2004.

MICHALKIEWICZ, E. L. *et al.* Clinical characteristics of small functioning adrenocortical tumors in children. **Med Pediatr Oncol**, Memphis, v. 28, n. 3, p. 175-178, 1997.

MILNER, J.; MEDCALF, E. A. Cotranslation of activated mutant p53 with wild type drives the wild-type p53 protein into the mutant conformation. **Cell**, Cambridge, v. 65, n. 5, p. 765-774, 1991.

OGAWA, O. *et al.* Relaxation of insulin-like growth factor II gene imprinting implicated in Wilms' tumour. Eccles MR. **Nature**, Dunedin, v. 362, n. 6422, p. 749-751, 1993.

PARKIN, D. M. *et al.* **International Incidence of Childhood Cancer**. 87 ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 1988.

PEREIRA, R. M. *et al.* Childhood adrenocortical tumors. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, Curitiba, v. 48, n. 5, p. 651-658, 2004.

PIANOVSKI, M. A. D. *et al.* Mortality rate of adrenocortical tumors in children under 15 years of age in Curitiba, Brazil. **Pediatric Blood & Cancer**, Curitiba, v. 47, n. 1, p. 56-60, 2006a.

PIANOVSKI, M. A. D. *et al.* SF-1 overexpression in childhood adrenocortical tumours. **Eur J Cancer**, Curitiba, v. 42, n. 8, p. 1040-1043, 2006b.

PIERGA, J. Y. *et al.* Carcinoma of the choroid plexus: a pediatric experience. **Med Ped Oncol**, Villejuif, v. 21, n. 7, p. 480-487, 1993.

PINTO, E. M. *et al.* Founder effect for the highly prevalent R337H mutation of tumor suppressor p53 in Brazilian patients with adrenocortical tumors. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, São Paulo, v. 48, n. 5, p. 647-650, 2004.

PIOVEZAN, G.C. **Prevalência do alelo TP53 R337H no Estado do Paraná**. 107 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

REIK, W. *et al.* Igf2 imprinting in development and disease. **Int J Dev Biol**, Cambridge, v. 44, n. 1, p. 145-150, 2000.

REINCKE, M. *et al.* p53 mutations in human adrenocortical neoplasms: immunohistochemical and molecular studies. **J Clin Endocrinol Metab**, Würzburg, v. 78, n. 3, p. 790-794, 1994.

RIBEIRO, R.C.; FIGUEIREDO, B. Childhood adrenocortical tumours. **Eur J Cancer**, Memphis, v. 40, n. 8, p. 1117-1126, 2004.

RIBEIRO, R. C. *et al.* An inherited p53 mutation that contributes in a tissue-specific manner to pediatric adrenal cortical carcinoma. **Proc Natl Acad Sci U.S.A**, Memphis, v. 98, n. 16, p. 9330-9335, 2001.

RIBEIRO, R.C. *et al.* Adrenocortical carcinoma in children: a study of 40 cases. **J Clin Oncol**, Memphis, v. 8, n. 1, p. 67-74, 1990.

RODRIGUEZ-GALINDO, C. *et al.* Biology, clinical characteristics, and management of adrenocortical tumors in children. **Pediatr Blood Cancer**, Memphis, v. 45, n. 3, p. 265-273, 2005.

ROSATI, R. *et al.* High frequency of loss of heterozygosity at 11p15 and IGF2 overexpression is not associated with clinical outcome in childhood adrenocortical tumors positive for the R337H TP53 mutation. **Cancer Genet Cytogenet**, Curitiba, v. 186, n. 1, p. 19-24, 2008.

RUIJS, M. W. *et al.* TP53 germline mutation testing in 180 families suspected of Li-Fraumeni syndrome: mutation detection rate and relative frequency of cancers in different familial phenotypes. **J Med Genet**, Amsterdam, v. 47, n. 6, p. 421-428, 2010.

RUSSELL-SWETEK, A. *et al.* Identification of a novel TP53 germline mutation E285V in a rare case of paediatric adrenocortical carcinoma and choroid plexus carcinoma. **J Med Genet**, Memphis, v. 45, n. 9, p. 603-606, 2008.

SANTOS, G.P. *et al.* Programa de triagem neonatal para fibrose cística no estado do Paraná: avaliação após 30 meses de sua implantação. **J Pediatr**, Rio de Janeiro, v. 81, n. 3, p. 240-244, 2005.

SCHILLING, F. H. *et al.* Neuroblastoma screening at one year of age. **N Engl J Med**, Stuttgart, v. 346, n. 14, p. 1047-1053, 2002.

SECRETARIA DO ESTADO DA SAÚDE DO GOVERNO DO PARANÁ. Faixa etária detalhada x regional de saúde do PR 2009. Disponível em < www.saude.pr.gov.br>. Acesso em 10/09/2010.

SEIDINGER, A. L. *et al.* Association of the Highly Prevalent TP53 R337H Mutation With Pediatric Choroid Plexus Carcinoma and Osteosarcoma in Southeast Brazil. **Cancer**, Campinas, v. 117, n. 10, p. 2228-2235, 2011.

SODERSTROM, L. *et al.* Health and economic benefits of well-designed evaluations: some lessons from evaluating neuroblastoma screening. **J Natl Cancer Inst**, Montreal, v. 97, n. 15, p. 1118-1124, 2005.

SOHN, S.; JAITOVITCH-GROISMAN, I.; BENLIMAME, N. Retroviral expression of the hepatitis B virus x gene promotes liver cell susceptibility to carcinogen-induced site specific mutagenesis. **Mutat Res**, Montreal, v. 460, n. 1, p. 17-28, 2000.

SORIA, C. *et al.* Heterochromatin silencing of p53 target genes by a small viral protein. **Nature**, San Diego, v. 466, n. 7310, p. 1076-1081, 2010.

STREET, M. E. *et al.* Girls with virilisation in childhood: a diagnostic protocol for investigation. **J Clin Pathol**, London, v. 50, n. 5, p. 379-383, 1997.

SUTTER, J. A.; GRIMBERG, A. Adrenocortical tumors and hyperplasias in childhood-etiology, genetics, clinical presentation and therapy. **Pediatr Endocrinol Rev**, Philadelphia, v. 4, n. 1, p. 32-39, 2006.

TABORI, U. *et al.* TP53 alterations determine clinical subgroups and survival of patients with choroid plexus tumors. **J Clin Oncol**, Toronto, v. 28, n. 12, p. 1995-2001, 2010.

TINAT, J. *et al.* 2009 Version of the Chompret Criteria for Li Fraumeni Syndrome. **J Clin Oncol**, Rouen, v. 27, n. 26, p. e108-e110, 2009.

US Preventive Services Task Force: Screening for sickle cell disease in newborns: US Preventive Services Task Force recommendation statement. Agency for Healthcare Research and Quality. 2007. Disponível em: <http://www.uspreventiveservicestaskforce.org/uspstf07/sicklecell/sicklers.htm#clinical>. Acesso em 13/04/2011.

VARLEY, J. M. *et al.* Are there low-penetrance TP53 Alleles? Evidence from childhood adrenocortical tumors. **Am J Hum Genet**, Manchester, v. 65, n. 4, p. 995-1006, 1999.

WAJCHENBERG, B.L. *et al.* Adrenocortical carcinoma: clinical and laboratory observations. **Am Cancer Soc**, São Paulo, v. 88, n. 4, p. 711-736, 2000.

WANG, J. S. *et al.* Protective alterations in phase 1 and 2 metabolism of aflatoxin B1 by oltipraz in residents of Qidong, People's Republic of China. **J Natl Cancer Inst**, Baltimore, v. 91, n. 4, p. 347-354, 1999.

WANG, W. *et al.* Insulin-like growth factor II and PAX3-FKHR cooperate in the oncogenesis of rhabdomyosarcoma. **Cancer Research**, Manchester, v. 58, n. 19, p. 4426-4433, 1998.

WEST, A. N. *et al.* Gene Expression Profiling of Childhood Adrenocortical Tumors. **Cancer Res**, Memphis, v. 67, n. 2, p. 600-608, 2007.

WILSON, J.M.; JUNGNER, Y.G. Principles and practice of mass screening for disease. **Bol Oficina Sanit Panam**, v. 65, n. 4, p.281-393,1968.

WOLFF, J. *et al.* Choroid plexus tumours. **Br J Cancer**, Calgary, v. 87, n. 10, p. 1086-1091, 2002.

YAN, W.; CHEN, X. Characterization of functional domains necessary for mutant p53 gain of function. **J Biol Chem**, Davis, v. 285, n. 19, p. 14229-14238, 2010.

YIN, Y.; TAINSKY, M. A.; BISCHOFF, F. Z. Wild-type p53 restores cell cycle control and inhibits gene amplification in cells with mutant p53 alleles. **Cell**, San Diego, v. 70, n. 6, p. 937-948, 1992.

ZAMBETTI, G. P. The p53 mutation "gradient effect" and its clinical implications. **J Cell Physiol**, Memphis, v. 213, n. 2, p. 370-373, 2007.

ZAMBETTI, G. P. *et al.* Wild-type p53 mediates positive regulation of gene expression through a specific DNA sequence element. **Genes Dev**, New Jersey, v. 6, n.7, p. 1143-1152, 1992.

ZANCANELLA, P. *et al.* Mitotane associated with cisplatin, etoposide, and doxorubicin in advanced childhood adrenocortical carcinoma: mitotane monitoring and tumor regression. **J Pediatr Hematol Oncol**, Curitiba, v. 28, n. 8, p. 513-524, 2006.

ANEXOS

ANEXO 1 - CEP HC – UFPR

ANEXO 2 - CONEP 06/09/2005

ANEXO 3 - CEP HPP

ANEXO 4 - CONEP 28/09/2009

ANEXO 5 - CONSENTIMENTO PARA TESTE NO SANGUE DO RN

ANEXO 6 - CONSENTIMENTO PARA O ACOMPANHAMENTO DO RN PELO
MÉDICO INDICADO

ANEXO 7 - CONSENTIMENTO PARA TESTE EM PARENTES MENORES DE 15
ANOS DE UM RN COM A MUTAÇÃO R337H *TP53* CONFIRMADA

ANEXO 8 - CONSENTIMENTO PARA TESTE EM PARENTES DE 15 A 18 ANOS
DE UM RN COM A MUTAÇÃO R337H *TP53* CONFIRMADA

ANEXO 9 - CONSENTIMENTO PARA TESTE EM PARENTES MAIORES DE 18
ANOS DE UM RN COM A MUTAÇÃO R337H *TP53* CONFIRMADA

ANEXO 10 - CONSENTIMENTO PARA ANÁLISE DE LOH EM CRIANÇAS

ANEXO 11 - CONSENTIMENTO PARA ANÁLISE DE LOH EM ADULTOS

ANEXO 12 - CONSENTIMENTO PARA ANÁLISE DE LOH EM CRIANÇAS
DIAGNOSTICADAS COM OUTROS TIPOS DE TUMORES

ANEXO 1 – CEP HC – UFPR

PARECER CEP

Protocolo: CEP-HC/UFPR 997.036/2005-02 CAAE: 0023.0.208.000-05

Projeto de Pesquisa: "VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA NO PARANÁ: GENOTIPAGEM, REDE INFORMATIZADA E ENCAMINHAMENTOS PARA UM CÂNCER PEDIÁTRICO HEREDITÁRIO QUE AUMENTA PROGRESSIVAMENTE NESTE ESTADO (TUMOR DE CÓRTEX ADRENAL)"

Pesquisador: Dr. Bonald Cavalcante de Figueiredo

Instituição: Hospital de Clínicas da UFPR

Área Temática Especial: Genética Humana.

Ao proceder à análise do projeto de pesquisa em questão, em resposta ao Parecer CONEP nº 1162/2005, comunicamos que as respostas apresentadas foram analisadas e encontram-se atendidas de forma objetiva. O investigador concorda com todas as alterações no TCLE enviando uma nova versão para análise a qual foi aprovada por este CEP.

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos – CEP, de acordo com as atribuições definidas na Res. 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto proposto, recomendando que o investigador aguarde o parecer final da CONEP para início da pesquisa no Centro.

Parecer do CEP: Aprovado

Curitiba, 10 de agosto de 2005.

PROF. DR. FLÁVIO DE QUEIROZ TELLES FILHO
Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
em Seres Humanos do Hospital de Clínicas / UFPR
CRM Nº 5778 - Mat. 88623

Renato Tambara Filho

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
em Seres Humanos do Hospital de Clínicas/UFPR

ANEXO 2 – CONEP 06/09/2005



MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

PARECER Nº 1557/2005

Registro CONEP: 11859 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

CAAE – 0023.0.208.000-05

Processo nº 25000.056983/2005-8:

Projeto de Pesquisa: *"Vigilância epidemiológica na Paraná: genotipagem, rede informatizada e encaminhamentos para um câncer pediátrico hereditário que aumenta progressivamente neste Estado".*

Pesquisador Responsável: Dr. Donald Cavalcante de Figueiredo

Instituição: Hospital de Clínicas/Universidade Federal do Paraná

Área Temática Especial: Genética humana.

Ao se proceder à análise do projeto de pesquisa em questão, em resposta ao Parecer CONEP nº 1162/2005, cabem as seguintes considerações:

- a) O pesquisador respondeu satisfatoriamente as pendências relativas a adequações nos Termos de Consentimento Livre e Esclarecido e modificação no corpo do texto conforme solicitado;
- b) As informações enviadas atendem aos aspectos fundamentais da Res. CNS 196/96 sobre diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos;
- c) O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da instituição supracitada.

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação: Protocolo aprovado

Brasília, 6 de setembro de 2005.

WILLIAM SAAD HOSSNE
Coordenador da CONEP/CNS/MS

ANEXO 3 – CEP HPP



Curitiba, 09 de setembro de 2009.

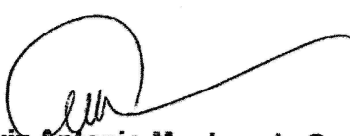
Bonald Cavalcante de Figueiredo
Pesquisador Responsável

Prezado Senhor,

Comunicamos que as recomendações solicitadas pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, do projeto de pesquisa intitulado **Triagem Neonatal, mapeamento da prevalência da mutação TP53 R337H por município, histórico de câncer, perfil sócio-econômico e alterações moleculares associadas com tumores de famílias do estado do Paraná** registro no CEP 0539-08, avaliado em reunião plenária em 31 de agosto de 2009, chegou-se ao seguinte parecer: **foi aprovado** e está de acordo com as normas éticas estabelecidas pela Resolução 196/96 do Ministério da Saúde.

Lembramos que conforme as normas da CONEP/MS o pesquisador deverá enviar ao CEP relatórios trimestrais sobre o andamento do estudo, bem como a qualquer tempo e a critério do pesquisador em caso de relevância. Salientamos ainda, a necessidade de relatório completo ao final do estudo.

Atenciosamente



Prof. Dr. Luiz Antonio Munhoz da Cunha
Coordenador do Comitê de Ética em
Pesquisa de Seres Humanos - HPP



ANEXO 4 – CONEP 28/09/2009



MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

PARECER Nº 677/2009

Registro CONEP 14884 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

CAAE -0612.0.015.000-08

Processo nº 25000.164047/2008-97

Projeto de Pesquisa: *"Triagem neonatal, mapeamento da prevalência da mutação TP53 R337H por município, histórico de câncer, perfil socioeconômico e alterações moleculares associadas com tumores de famílias do estado do Paraná".*

Pesquisador Responsável: Bonald Cavalcante de Figueiredo

Instituição: Hospital Pequeno Príncipe/PR (**CENTRO ÚNICO**)

CEP de origem: Hospital de Crianças César Pernetta e infantil Pequeno Príncipe/PR

Área Temática Especial: Cooperação estrangeira; Genética humana

Patrocinador: CNPq

Considerações sobre a análise das respostas ao Parecer CONEP Nº 406/2009, relativo ao projeto de pesquisa em questão:

1. Inseriu-se nas novas versões de TCLE uma declaração afirmando que as amostras biológicas a serem coletadas não serão utilizadas para formação de banco de amostras ou para qualquer outro tipo de análise que não mencionada neste protocolo de pesquisa. Recomendação parcialmente atendida, pois não foi apresentada nova folha de rosto com as devidas alterações.

Resposta: Foi apresentada nova Folha de Rosto, informando que não haverá formação de banco de materiais biológicos.

Análise: Recomendação **atendida**.

2. Esclareceu-se que não haverá formação de banco de material biológico, porém, falta alterar folha de rosto.

Resposta: Foi apresentada nova Folha de Rosto, informando que não haverá formação de banco de materiais biológicos.

Análise: Recomendação **atendida**.

3. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – elaborado na forma de convite descrevem os objetivos, os benefícios e as garantias de confidencialidade. Estão divididos por 6 grupos, os quais sejam: Para menores de 18 anos de idade com diagnóstico de TCA; Para adulto(a) portador(a) da mutação R337H no gene TP53; Para voluntário(a) adulto(a) portador(a) da mutação R337H no gene TP53 e diagnosticado(a) com qualquer tipo de câncer; Para voluntário(a) com idade abaixo de 18 anos, portador(a) da mutação R337H no gene TP53 e diagnosticado(a) com qualquer tipo de câncer para respostas ao questionário sobre perfil sócio-econômico, história gestacional, fatores ambientais e história mórbida da criança; Para os pais de criança com tumor de córtex adrenal portadora da mutação R337H no gene TP53. Entretanto, em ambas as versões apresentadas, cabem as seguintes observações:

- a) Os TCLEs sofreram modificações na sua linguagem, porém, mantém termos de difícil entendimento pelo sujeito sem que sejam dadas as devidas explicações sobre os mesmos. Pendência não atendida.

Resposta: Foram apresentadas novas versões de TCLE com a linguagem adequada.

Cont. Parecer CONEP 677/2009

Análise: Recomendação atendida.

d) Não foi incluída no TCLE nenhuma alusão ao plano de aconselhamento genético.
Pendência não atendida.

Resposta: Foi acrescentada a seguinte informação no TCLE "Estou ciente de que eu e meus familiares iremos receber aconselhamento genético sobre a possibilidade de acontecer câncer em crianças e adolescentes de córtex adrenal e, ainda, sobre a possibilidade de acontecer outros tipos de câncer em crianças e adultos da minha família, sempre levando em consideração ao que já foi sugerido ou indicado em resultados de pesquisas realizadas por este grupo ou qualquer outro grupo de pesquisadores sobre riscos da mutação R337H no gene TP53 presente em alguns membros da nossa família.

Análise: Recomendação atendida.

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação: **Protocolo aprovado.**

Brasília, 28 de setembro de 2009.


Gyselle Saddi Tannous
Coordenadora da CONEP/CNS/MS

ANEXO 5 – CONSENTIMENTO PARA TESTE NO SANGUE DO RN

RESPONDA SE DESEJAR (marque com X)

Considere criança até 15 anos de idade e adulto acima de 15 anos.

1. Na minha família teve câncer em:

- ☐ 1 criança ☐ 2 crianças ☐ mais de 2 crianças
☐ 1 adulto ☐ 2 adultos ☐ mais de 2 adultos

Na família de meu esposo teve câncer em:

- ☐ 1 criança ☐ 2 crianças ☐ mais de 2 crianças
☐ 1 adulto ☐ 2 adultos ☐ mais de 2 adultos

2. Os locais ou tipos de câncer encontrados em crianças foram:

- ☐ Mama ☐ Cérebro ☐ Próstata ☐ Leucemia (sangue)
☐ Ovário ☐ Testículo ☐ Útero ☐ Estômago
☐ Intestino ☐ Fígado ☐ Pulmão ☐ Pele
☐ Pescoço ☐ Esôfago ☐ Garganta ☐ Rim
☐ Osso ☐ Tumor na glândula adrenal ☐ Não sei
☐ Outro tipo de câncer é: _____

3. Os locais ou tipos de câncer encontrados em adultos foram:

- ☐ Mama ☐ Cérebro ☐ Próstata ☐ Leucemia (sangue)
☐ Ovário ☐ Testículo ☐ Útero ☐ Estômago
☐ Intestino ☐ Fígado ☐ Pulmão ☐ Pele
☐ Pescoço ☐ Esôfago ☐ Garganta ☐ Rim
☐ Osso ☐ Tumor na glândula adrenal ☐ Não sei
☐ Outro tipo de câncer é: _____

4. A minha família é uma mistura de:

- ☐ Branco ☐ Negro ☐ Pardo ☐ Amarelo ☐ Índio
☐ Português ☐ Italiano ☐ Polonês ☐ Alemão ☐ Russo
☐ Ucraniano ☐ Japonês ☐ Paraguaio ☐ Argentino ☐ Libanês
☐ Espanhol ☐ Outra raça européia ☐ Outra raça oriental
☐ Chinês ☐ América do Sul (outros) ☐ Outros

5. A família de meu esposo é uma mistura de:

- ☐ Branco ☐ Negro ☐ Pardo ☐ Amarelo ☐ Índio
☐ Português ☐ Italiano ☐ Polonês ☐ Alemão ☐ Russo
☐ Ucraniano ☐ Japonês ☐ Paraguaio ☐ Argentino ☐ Libanês
☐ Espanhol ☐ Outra raça européia ☐ Outra raça oriental
☐ Chinês ☐ América do Sul (outros) ☐ Outros



0 5 1 0 0 0 0 0 1 5 0

Maternidade:
Município da Mat.:

FUNDAÇÃO HOSPITALAR MATERNIDADE SANTA AI

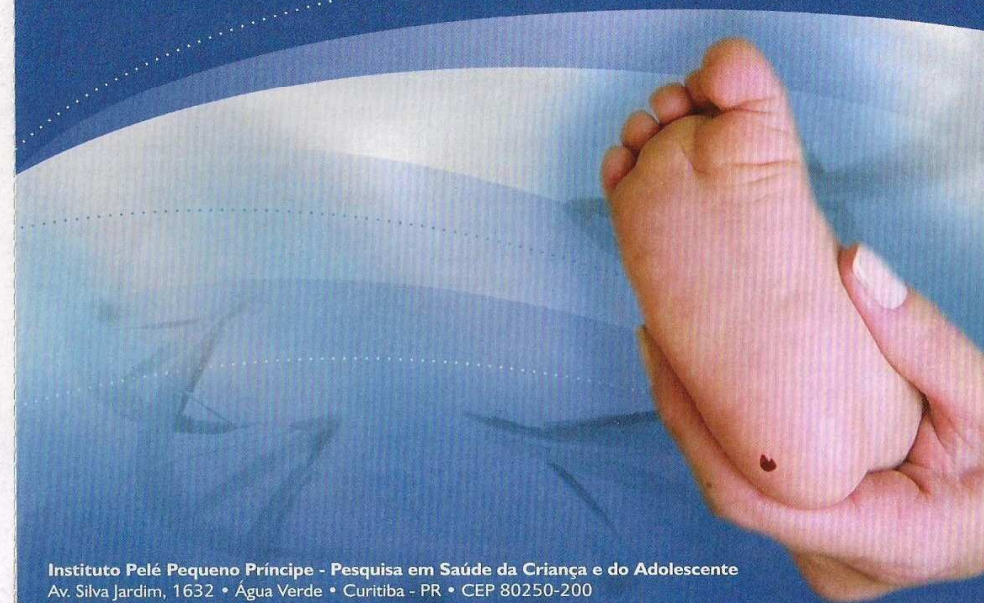


0 5 1 0 0 0 0 0 1 5 0

Teste de DNA

Proteja seu filho do câncer de córtex adrenal

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)



Instituto Pelé Pequeno Príncipe - Pesquisa em Saúde da Criança e do Adolescente

Av. Silva Jardim, 1632 • Água Verde • Curitiba - PR • CEP 80250-200

Tel / fax: (41) 3310 1126 • e-mail: curadotca@hpp.org.br

Centro de Genética Molecular e Pesquisa de Câncer em Crianças - Universidade Federal do Paraná

R. Agostinho Leão Jr., 400 • Alto da Glória • Curitiba - PR • CEP 80030-110

Tel: (41) 3363 6264

REALIZAÇÃO:

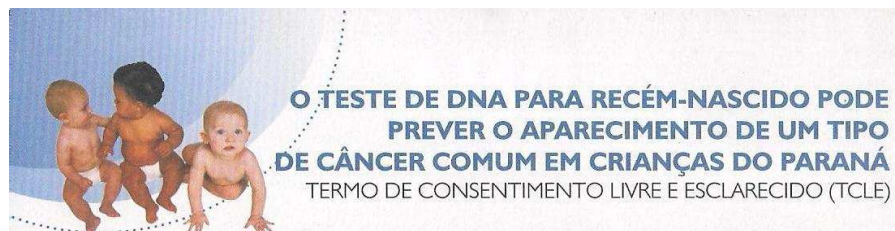


PATROCÍNIO:



APOIO:





O TESTE DE DNA PARA RECÉM-NASCIDO PODE PREVER O APARECIMENTO DE UM TIPO DE CâNCER COMUM EM CRIANÇAS DO PARANÁ

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

O QUE A MÃE DO RECÉM-NASCIDO PRECISA SABER: *este teste, feito com uma gota de sangue, pode identificar, na criança, uma alteração genética (chamada mutação) responsável pelo surgimento de um tumor em uma das glândulas adrenais, localizadas sobre os rins. Esse câncer, embora seja raro em outros países e em outros estados do Brasil, tem no Paraná uma frequência de 12 a 18 vezes maior. Por isso, se a mãe é paranaense, a chance da criança ter a mutação é em torno de 1 em 1500 (uma em mil e quinhentas). Esse tipo de alteração PODE OU NÃO ser herdada de um dos pais. Quando diagnosticado precocemente e tratado adequadamente esse tipo de tumor tem quase 100% de chance de cura.* Alguns casos são diagnosticados tardiamente e a cura pode não ser mais possível. Por esse motivo, é importante realizar o exame. É importante lembrar que esse exame precisa ser feito antes da criança completar 1 ano de vida.

Se você ainda tiver dúvidas a respeito do teste ou desejar saber mais sobre o assunto basta entrar em contato com o coordenador desta pesquisa, Dr. Bonald C. Figueiredo, pelo telefone (41) 3363 6264 ou (41) 3310 1126.

Esta campanha foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná e Hospital Pequeno Príncipe, em Curitiba.

DECLARAÇÃO DA MÃE:

"Estou ciente de que receberei o resultado do teste na maternidade em 2 meses. Como em todos os tipos de exame, existe uma possibilidade muito pequena de haver erro, o que não pode ser previsto, por isso os resultados positivos serão sempre repetidos. Se o resultado for positivo, receberei orientação e todo apoio de uma equipe de especialistas, e de um médico da rede de saúde pública próxima de minha residência. A minha criança poderá ser acompanhada por um pediatra ou médico de minha escolha (e responsabilidade) e também receberá suporte da equipe desta pesquisa.

Depois de identificada a alteração no DNA o acompanhamento terá como objetivo diagnosticar precocemente o câncer. Em caso de aparecimento do tumor, minha criança, após autorização, poderá ser submetida à cirurgia, com chances de cura de quase 100%. O teste e todas as instruções para o acompanhamento (oferecido somente às crianças com teste positivo) serão inteiramente gratuitos. É importante saber ainda que o nome do meu bebê não aparecerá em futuras publicações e que a **AMOSTRA DE SANGUE NÃO SERÁ USADA PARA OUTRA FINALIDADE.**"

ATENÇÃO MÃE, por favor não leve este termo para sua casa, porque outra criança poderá ficar sem fazer o exame. Este TCLE obedecerá todas as normas estabelecidas na Resolução 196/96 para garantia dos seus direitos.

Sim, eu mãe da criança, li o TCLE (ou alguém leu para mim), entendi as explicações ao lado, considero esclarecidas todas as minhas dúvidas e autorizo a realização deste teste. Estou ciente das perguntas sobre câncer na família no verso deste termo e poderei ou não respondê-las.

Nome: _____

CPF: _____ RG: _____

Endereço completo: _____

CEP: - Cidade: _____ Estado: _____

Tel.: () _____ Celular: () _____

Assinatura

(ou impressão digital)

Nome da
Maternidade: _____

Nº da declaração
de nascido vivo: _____



SANGUE

**ANEXO 6 – CONSENTIMENTO PARA O ACOMPANHAMENTO DO RN
PELO MÉDICO INDICADO**

Código do recém-nascido:

R337H em Parentes < 18 anos

Página 1 de 3

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Consentimento para acompanhamento de seu(sua) filho(a) por um médico com suporte da equipe do projeto abaixo:

“VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA NO PARANÁ: GENOTIPAGEM, REDE INFORMATIZADA E ENCAMINHAMENTOS PARA UM CÂNCER PEDIÁTRICO HEREDITÁRIO QUE AUMENTA PROGRESSIVAMENTE NESTE ESTADO (tumor de córtex adrenal)”

Fui consultada na maternidade e concordei em submeter meu(minha) filho(a) a um exame para verificar se ele(a) é portador(a) de uma alteração no DNA, chamada mutação, que pode ser responsável pelo aparecimento de um tipo de tumor, o qual ocorre nas glândulas adrenais (situadas sobre os rins), principalmente em crianças com menos de 4 anos.

Eu já conversei com o coordenador desta pesquisa pelo telefone e pude ouvir todas as explicações sobre o que significa uma criança ter resultado positivo para esse teste. Aceitei receber maiores explicações por meio de material impresso (uma cartilha) e áudio-visual (um vídeo), além da conversa com o médico indicado para meu(minha) filho(a). Neste presente termo, eu estou sendo consultada para decidir se aceito que meu(minha) filho(a) seja submetido(a) ao um acompanhamento pelo médico apresentado na cartilha anexa, com suporte de membros da equipe deste projeto.

Foi explicado a mim, pelo telefone e por meio da cartilha e do vídeo, que o risco de meu(minha) filho(a) apresentar o tumor na glândula adrenal é em torno de 10% e que - se isso acontecer - é mais provável que seja nos primeiros 4 anos de idade. Foi esclarecido também que o objetivo da equipe é oferecer ao(a) meu(minha) filho(a) a oportunidade de que, caso se desenvolva, esse tumor seja diagnosticado precocemente e retirado, o mais breve possível, através de uma cirurgia com grande chance de cura. Foi explicado que a equipe desta pesquisa não pode impedir o aparecimento do câncer, mas que, com certeza ela proporcionará uma chance de quase 100% de cura, sendo necessário para isso que meu(minha) filho(a) participe regularmente deste programa de proteção.

Quais os riscos deste acompanhamento?


Estou ciente de que, durante a coleta de sangue para dosagem de hormônios (produzidos pelo tumor), minha criança poderá se queixar de dor em razão da picada da agulha. Sei que há uma pequena chance de que ela desmaie, bem como que poderá haver um pequeno sangramento no local da introdução da agulha. Além disso, tenho ciência de que poderá haver algum impacto psicológico pelo fato da minha criança estar regularmente sendo examinada pelo médico e realizando dosagens hormonais e exames de imagem (ecografia).

Que outras opções existem?

Posso escolher não participar deste estudo.

O que se sabe sobre informação nova?

Foi avisado a mim que serei informada a respeito de qualquer informação nova obtida durante o curso deste acompanhamento e que, caso seja de minha vontade, posso saber quando e como obter informações sobre esta pesquisa, entrando em contato com o Dr. Bonald Cavalcante de Figueiredo pelo telefone (0XX41) [REDACTED]


Renato Tambara Filho
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
em Seres Humanos do Hospital de Clínicas-UFPR
CRM 3369 - Matrícula 122475

41-9198-1988

Código do recém-nascido:

R337H em Parentes < 18 anos

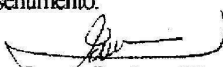
Página 2 de 3

O que dizer sobre confidencialidade?

Fui informada de que a identidade de minha criança será codificada e de que o código e o resultado dos exames serão armazenados separadamente em arquivos diferentes. Tenho conhecimento de que as informações codificadas serão guardadas no CEGEMPAC de Curitiba, sob os cuidados do Dr. Bonald C. Figueiredo, sem menção ao nome da minha criança.

DECLARAÇÃO DE ENTENDIMENTO

1. Eu li o texto acima e aceito de livre e espontânea vontade que minha criança tome parte deste acompanhamento.
2. Tive a oportunidade de conversar abertamente com o Dr. Bonald C. Figueiredo e com o Dr. _____, médico que irá cuidar de minha criança cujo teste foi positivo, sobre as razões deste estudo e sobre seus riscos.
3. Estou ciente de que este estudo poderá ter alguns riscos, apontados acima ou outros ainda não previstos.
4. Estou ciente de que posso retirar minha criança deste estudo quando desejar.
5. Fui devidamente informada de que não haverá custos adicionais para que minha criança participe desta pesquisa.
6. Fui informada de que é norma do CEGEMPAC não pagar para que qualquer pessoa participe deste estudo ou de outros estudos realizados por essa instituição.
7. Fui informada de que caso venha a acontecer em minha criança alguma injúria decorrente da picada realizada para a coleta de sangue, ela receberá suporte dos médicos desta equipe e terá acesso a um acompanhamento com psicólogos caso seja necessário.
8. Fui informada de que os dados clínicos da minha criança não serão disponibilizados para qualquer pessoa que não faça parte desta equipe.
9. Estou ciente de que, quando eu precisar esclarecer mais dúvidas a respeito deste estudo ou sobre injúrias que ocorrerem devido à coleta de sangue, posso entrar em contato com o Dr. Bonald C. Figueiredo através do telefone (0XX41) 3363 62 64 (CEGEMPAC de Curitiba).
10. Sei que posso obter mais informações sobre meus direitos como participante deste estudo através do escritório da Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (0XX41 3360 1896 ou 0XX41 3363 2927) e que os direitos de minha criança como participante desta pesquisa estarão protegidos como determina a Resolução 196/96.
11. Receberei uma cópia deste termo de consentimento.


Renato Tambara Filho
Coordenador de Comitê de Ética em Pesquisa
em Seres Humanos do Hospital de Clínicas-UFPR
CRM 3369 - Matrícula 122475

Código do recém-nascido:

R337H em Parentes < 18 anos

Página 3 de 3

DECLARAÇÃO DA MÃE /DO PAI OU GUARDIÃO

Eu li (ou alguém leu para mim) o conteúdo deste formulário de consentimento, fui incentivada a fazer perguntas sobre ele e todas elas foram devidamente respondidas. Eu dou permissão para que minha criança faça o acompanhamento com o(a) médico(a) Dr.(a) _____, que contará com o auxílio da equipe deste projeto.

Nome: _____

Assinatura da mãe (ou pai ou guardião) _____

Local e data _____

Hora _____

Eu li (ou alguém leu para mim) o conteúdo deste formulário e **NÃO AUTORIZO O ACOMPANHAMENTO DA MINHA CRIANÇA, MAS FUI INFORMADA DE QUE, MESMO ASSIM, PODEREI PROCURAR AJUDA E ESCLARECIMENTOS DA EQUIPE QUANDO OUISER.**

Assinatura da mãe (ou pai ou guardião) _____

Local e data _____

Hora _____

DECLARAÇÃO DO MÉDICO/PESQUISADOR OU DE PESSOA DESIGNADA PELO MÉDICO RESPONSÁVEL

Eu, abaixo assinado, certifico que discuti o projeto de pesquisa com o(s) pai(s) da criança participante. Expliquei todas as informações apresentadas neste termo de consentimento, incluindo sobre os riscos que podem dele decorrer. Declaro, ainda, que a mãe, o pai ou o guardião, bem como o próprio paciente, foram incentivados a fazer perguntas sobre este estudo.

Nome: _____

Médico(a) designado(a) _____

Local e data _____

Hora _____

DECLARAÇÃO DA TESTEMUNHA

Eu acompanhei o processo de consentimento informado e certifico que a pesquisa, o teste de DNA, o acompanhamento proposto para as crianças, os riscos, os benefícios e as opções de tratamento foram apresentadas ao voluntário.

Nome: _____

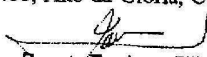
Testemunha _____

Local e data _____

Hora _____

Em caso de perguntas ou emergências com referência a este protocolo, por favor contatar diretamente: CEGEMPAC, Rua Agostinho Leão Júnior, 400, Alto da Glória, Curitiba, PR, 80.060-240, telefone (0XX41) _____

41. 9198. 1988


Renato Tambara Filho
 Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
 em Seres Humanos do Hospital de Clínicas-UFPR
 CRM 3369 - Matrícula 122475

**ANEXO 7 - CONSENTIMENTO PARA TESTE EM PARENTES MENORES
DE 15 ANOS DE UM RN COM A MUTAÇÃO R337H *TP53* CONFIRMADA**

Código do recém-nascido

Parentes com < 15 anos
Página 1 de 4

Consentimento para teste da mutação TP53 R337H em parentes com menos de 15 anos.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**“VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA NO PARANÁ: GENOTIPAGEM, REDE INFORMATIZADA E ENCAMINHAMENTOS PARA UM CÂNCER PEDIÁTRICO HEREDITÁRIO QUE AUMENTA PROGRESSIVAMENTE NESTE ESTADO (tumor de córtex adrenal)”**

Eu li a cartilha, assisti ao vídeo e tive a oportunidade de tirar minhas dúvidas sobre a alteração no DNA encontrada no recém-nascido de minha família. Fui consultado(a) para realizar um exame de DNA que irá verificar se meu(minha) filho(a) é portador(a) dessa mesma alteração no DNA (chamada mutação), a qual pode estar presente ou não em vários de meus familiares. Essa mutação é responsável pelo aparecimento de um tipo de tumor nas glândulas adrenais que ficam sobre os rins e ele pode ou não se desenvolver em crianças de até 15 anos de idade, sendo mais frequente, entretanto, antes dos 4 anos.

Entendi tudo que foi apresentado sobre este estudo, concordei em fazer o teste na minha criança e assinei este termo consciente de que ainda posso solicitar respostas e esclarecimentos a respeito de possíveis dúvidas sobre a presente pesquisa, entrando em contato direto ou por meio do telefone (0XX41) [REDACTED] com o Dr. Ronald C. Figueiredo.

11 - 9098 - 1988

Por que este estudo está sendo realizado?

Sei que a equipe está tentando descobrir quem são e onde moram os parentes do recém-nascido que apresentam a mesma alteração encontrada nele. É de meu conhecimento que os familiares portadores da mutação receberão informações, sobre ela, e aconselhamento genético.

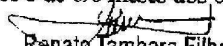
Qual é o envolvimento deste estudo?

Estou ciente de que será coletada, da polpa digital de meu(minha) filho(a), uma gota de sangue e de que essa amostra de sangue será utilizada para realizar um teste de DNA que tem como objetivo saber apenas se ele(a) possui ou não a mutação.

Entendi que este estudo procura investigar apenas a alteração específica do DNA que causa o tumor e que o material da amostra não será utilizado para fazer nenhum outro tipo de teste, referente a outras doenças ou situações clínicas.

Quanto tempo meu(minha) filho(a) ficará neste estudo?

Após coletar de meu(minha) filho(a) uma única gota de sangue, ele(a) não precisará realizar outros testes, ESTOU CIENTE, PORÉM, DE QUE ELE(A) PODERÁ SER CONVIDADO(A) A FAZER UM ACOMPANHAMENTO MÉDICO ATÉ QUE COMPLETE 15 ANOS DE IDADE (sendo de 3/3 meses até os 4 anos de idade, de 4/4 meses entre 4 e 8 anos e de 6/6 meses dos 8 aos 15 anos de idade), CASO ELE(A) SEJA PORTADOR DA MUTAÇÃO.


Renato Tambara Filho

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
em Seres Humanos do Hospital de Clínicas-UFPR
CRM 3369 - Matrícula 122475

Código do recém-nascido

Parentes com < 15 anos
Página 2 de 4

Quais são as consequências da desistência de continuar neste estudo?

Nenhuma. Sei que posso retirar seu(sua) filho(a) deste estudo a qualquer momento e que, caso resolva inseri-lo mais tarde, poderei submetê-lo(la) ao teste.

Quais os riscos deste estudo?

Durante a coleta de sangue, meu(minha) filho(a) poderá sentir dor devido à picada. Estou ciente de que há uma pequena chance de desmaio ou de sangramento no local de introdução da lanceta, localizado na polpa digital ou na orelha. É de meu conhecimento também que poderá haver transtornos psicológicos e que, caso isso ocorra, psicólogos da equipe estarão disponíveis para proporcionar o suporte necessário.

Quais são os benefícios deste estudo?

Entendi que as informações obtidas a partir deste estudo propiciarão à equipe um melhor entendimento sobre o tumor que acontece devido àquela mesma alteração no DNA. Os resultados poderão auxiliar a compreensão das chances de desenvolvimento desse tumor em algumas crianças e, caso meu(minha) filho(a) também seja portador(a) da mutação, poderá se beneficiar de um aconselhamento quando tiver seus próprios filhos.

Que outras opções existem?

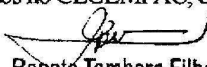
Posso escolher que meu(minha) filho(a) não participe deste estudo.

O que se sabe sobre informação nova?

Eu tenho o direito de saber sobre os resultados deste estudo e estou ciente de que, se for de minha vontade saber mais sobre quando e como obter esses resultados, posso falar diretamente com o coordenador desta pesquisa, Dr. Ronald Cavalcante de Figueiredo, pelo telefone (0XX41) 3363 62 64.

O que dizer sobre confidencialidade?

Sei que a identidade e o resultado do teste de meu(minha) filho(a) serão arquivados separadamente em arquivos diferentes e que os resultados serão guardados no CEGEMPAC, de Curitiba, sob os cuidados do Dr. Ronald C. Figueiredo.


Renato Tambara Filho
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
em Seres Humanos do Hospital de Clínicas-UFPR
CRM 3369 - Matrícula 122475

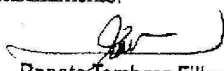
Código do recém-nascido

Parentes com < 15 anos
Página 3 de 4**DECLARAÇÃO DE ENTENDIMENTO**

1. Eu li o texto acima e aceito de livre e espontânea vontade tomar parte neste estudo.

Tive a oportunidade de conversar abertamente com o Dr. _____, médico responsável pelo acompanhamento da primeira criança de minha família cujo teste foi positivo, sobre as razões deste estudo e em relação aos seus riscos. Tive acesso à cartilha ("Cartilha para o Diagnóstico Precoce e Cura do Tumor de Córtex Adrenal de Crianças") e ao vídeo (sobre "Detecção Precoce e Cura do Tumor de Córtex Adrenal em Crianças"), além da chance de esclarecer todas as minhas dúvidas com o coordenador desta pesquisa, Dr. Bonald C. Figueiredo.

2. Estou ciente de que este estudo poderá ter riscos, como dor provocada pela perfuração da polpa digital de meu(minha) filho(a) para coleta de sangue, impacto psicológico e alguma forma de transtorno ou incômodo por se tratar de uma alteração no DNA.
3. Fui informado de que é norma do CEGEMPAC não pagar para qualquer pessoa com o objetivo de que ela participe deste estudo, bem como de qualquer outro estudo realizado por essa instituição.
4. Estou ciente de que eu, meu(minha) filho(a) e meus familiares poderemos receber todo suporte da equipe desta pesquisa para eventuais problemas relacionados à coleta de sangue e caso se faça necessário o suporte de profissionais médicos e/ou psicólogos.
5. Estou ciente de que quando eu precisar esclarecer mais dúvidas a respeito deste estudo ou sobre injúrias de qualquer natureza posso telefonar para o coordenador, Dr. Bonald C. Figueiredo, através do fone (0XX41) 3363 62 64 (CEGEMPAC de Curitiba).
6. Sei que poderei obter mais informações sobre os meus direitos como participante deste estudo através do escritório da Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (0XX41 3360 1896 ou 0XX41 3363 2927).
7. Receberei uma cópia deste termo de consentimento.


Renato Tambara Filho
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
em Seres Humanos do Hospital de Clínicas-UFPR
CRM 3369 - Matrícula 122475

Código do recém-nascido _____

Parentes com < 15 anos
Página 4 de 4**DECLARAÇÃO DO PARENTE COM IDADE ABAIXO DE 15 ANOS**

Eu li (ou alguém leu para mim) o conteúdo deste formulário de consentimento e fui incentivado a fazer perguntas sobre ele. Declaro que todas as minhas perguntas foram devidamente respondidas e que aceito participar desta pesquisa.

Nome: _____

Assinatura _____

Local e data _____

Hora _____

DECLARAÇÃO DO MÉDICO/PESQUISADOR OU DE PESSOA DESIGNADA PELO MÉDICO RESPONSÁVEL

Eu, abaixo assinado, certifico que discuti o projeto de pesquisa com o guardião (mãe ou pai) até que não houvesse mais dúvidas.

Nome: _____

Médico/pesquisador ou designado _____

Local e data _____

Hora _____

DECLARAÇÃO DA TESTEMUNHA

Eu acompanhei o processo de consentimento informado e certifico que a pesquisa, o teste de DNA, o acompanhamento proposto para as crianças, o aconselhamento genético para os adultos, os riscos, benefícios e opções de tratamento foram apresentadas ao voluntário.

Nome: _____

Testemunha _____

Local e data _____

Hora _____

Parentesco do voluntário com o recém-nascido que teve teste positivo: () Pai; () Mãe; () Irmão; () Irmã; () Tio; () Tia; () Primo; () Prima; () Avô; () Avó; () Outro:

Observação: o MENOR só deverá fazer o teste apenas se já for confirmado que ele pertence ao lado da família de onde vem a alteração.

Em caso de perguntas ou emergências com referência a este protocolo, por favor contatar diretamente: CEGEMrAC, Rua Agostinho Leão Júnior, 400, Alto da Glória, Curitiba, PR, 80.060-240, telefone (0XX41) (41) 94 98 - 13 88


Renata Tambara Filho

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
em Seres Humanos do Hospital de Clínicas-UFPR
RM 3369 - Matrícula 122475

**ANEXO 8 - CONSENTIMENTO PARA TESTE EM PARENTES DE 15 A 18
ANOS DE UM RN COM A MUTAÇÃO R337H *TP53* CONFIRMADA**

Código do recém-nascido

R337H em Parentes < 18 anos
Página 1 de 4

Consentimento para teste da mutação TP53 R337H em parentes de 15 a 18 anos.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**“VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA NO PARANÁ: GENOTIPAGEM, REDE INFORMATIZADA E ENCAMINHAMENTOS PARA UM CâNCER PEDIÁTRICO HEREDITÁRIO QUE AUMENTA PROGRESSIVAMENTE NESTE ESTADO (tumor de córtex adrenal)”**

Para maiores detalhes, antes de ler este termo, aconselha-se que você leia a cartilha e assista ao vídeo, entregue aos pais do recém-nascido com a alteração no DNA. Você foi consultado(a) para realizar um exame de DNA que verificará se você é também portador(a) dessa mesma alteração (chamada mutação), a qual pode ou não aparecer em vários membros da família. Recomenda-se também que você tire todas as dúvidas com relação à pesquisa antes de assinar este termo, podendo inclusive entrar em contato direto com o coordenador desta pesquisa, Dr. Bonald C. Figueiredo por meio do telefone (0XX41) [REDACTED]. Essa mutação pode ser responsável pelo aparecimento de um tipo de tumor, que ocorre nas glândulas adrenais (situadas sobre os rins) de crianças, principalmente naquelas com menos de 4 anos. (41) 9198-1988

Este termo de consentimento lhe dará informações sobre o estudo que será discutido com você. Assim que você entender esse estudo e, se concordar em participar dele, será solicitada sua assinatura e você receberá uma cópia do termo.

Inicialmente, é importante que você saiba que fica inteiramente a seu critério decidir se participa ou não deste estudo. Como você tem menos de 18 anos, um dos seus pais também precisa ler este termo, tirar todas as dúvidas que tiver e, somente depois, assinar caso concorde com a realização do exame. Mesmo sendo menor de idade, o exame não será feito se isso não for de sua vontade.

Por que este estudo está sendo realizado?

Tenho conhecimento de que a equipe está tentando descobrir quem são e onde moram os parentes do recém-nascido que apresentam a mesma alteração encontrada nele e que aqueles, portadores a mutação, receberão informações sobre ela e aconselhamento genético.

Qual é o envolvimento deste estudo?

Estou ciente de que será coletada, de minha polpa digital, uma gota de sangue e de que essa amostra será utilizada para realizar um teste de DNA que tem como objetivo saber apenas se eu possuo ou não a mutação.

Sei que este estudo procura investigar apenas a alteração específica do DNA que causa o tumor e que o material da amostra não será utilizado para fazer nenhum outro tipo de teste, referente a outras doenças ou situações clínicas.

Quanto tempo ficarei neste estudo?

Entendi que após a coleta de uma única gota do meu sangue, eu não precisarei realizar mais testes nem serei acompanhado(a) por nossa equipe de pesquisa.


Renato Lambera Filho
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital de Clínicas-UFPR
Matrícula 122475

Código do recém-nascido

R337H em Parentes < 18 anos

Página 2 de 4

Quais são as consequências da desistência de continuar neste estudo?

Nenhuma. Sei que posso desistir de continuar neste estudo a qualquer momento e, caso resolva participar mais tarde, poderei me submeter ao teste.

Quais os riscos deste estudo?

Estou ciente de que, durante a coleta de sangue, poderei sentir dor devido à picada e de que há uma pequena chance de desmaio ou de sangramento no local de introdução da lanceta, localizado na polpa digital ou na orelha.

Quais são os benefícios deste estudo?

Tenho conhecimento que as informações obtidas a partir deste estudo propiciarão à equipe um melhor entendimento sobre o tumor que acontece devido àquela mesma alteração no DNA e que os resultados poderão auxiliar a compreensão das chances de desenvolvimento desse tumor em algumas crianças. Entendi que, caso eu também seja portador da mutação, poderei me beneficiar de um aconselhamento quando tiver meus próprios filhos.

Que outras opções existem?


Posso escolher não participar deste estudo.

O que se sabe sobre informação nova?

Sei que tenho o direito de saber sobre os resultados deste estudo e que, se for de minha vontade saber mais sobre quando e como obter esses resultados, posso falar diretamente com o coordenador desta pesquisa, Dr. Bonald Cavalcante de Figueiredo, pelo telefone (0XX41) 3363 62 64.

O que dizer sobre confidencialidade?

Tenho conhecimento que o código de minha identidade e o resultado do teste serão armazenados separadamente em arquivos diferentes e que as informações codificadas serão guardadas no CEGEMPAC de Curitiba, sob os cuidados do Dr. Bonald C. Figueiredo.


Renato Tambara Filho
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
em Seres Humanos do Hospital de Clínicas-UFPR
CRM 3369 - Matrícula 122475

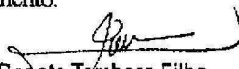
Código do recém-nascido

R337H em Parentes < 18 anos
Página 3 de 4**DECLARAÇÃO DE ENTENDIMENTO**

1. Eu li o texto acima e aceito de livre e espontânea vontade tomar parte neste estudo.

Tive a oportunidade de conversar abertamente com o Dr. _____, médico responsável pelo acompanhamento da primeira criança de minha família cujo teste foi positivo, sobre as razões deste estudo e em relação aos seus riscos. Tive acesso à cartilha ("Cartilha para o Diagnóstico Precoce e Cura do Tumor de Córtex Adrenal de Crianças") e ao vídeo (sobre "Detecção Precoce e Cura do Tumor de Córtex Adrenal em Crianças"), além da chance de esclarecer todas as minhas dúvidas com o coordenador desta pesquisa, Dr. Bonald C. Figueiredo.

2. Estou ciente de que este estudo poderá ter riscos, como dor provocada pela perfuração da minha polpa digital para coleta de sangue, impacto psicológico e alguma forma de transtorno ou incômodo por se tratar de uma alteração no DNA.
3. Fui informado de que é norma do CEGEMPAC não pagar para qualquer pessoa com o objetivo de que ela participe deste estudo, bem como de qualquer outro estudo realizado por essa instituição.
4. Estou ciente de que eu e meus familiares poderemos receber todo suporte da equipe desta pesquisa para eventuais problemas relacionados à coleta de sangue em minha polpa digital e caso se faça necessário o suporte de profissionais médicos e/ou psicólogos.
5. Estou ciente de que quando eu precisar esclarecer mais dúvidas a respeito deste estudo ou sobre injúrias de qualquer natureza poderei telefonar para o coordenador, Dr. Bonald C. Figueiredo, através do telefone (0XX41) 3363 62 64 (CEGEMPAC de Curitiba).
6. Sei que poderei obter mais informações sobre os meus direitos como participante deste estudo através do escritório da Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (0XX41 3360 1896 ou 0XX41 3363 2927).
7. Receberei uma cópia deste termo de consentimento.


Renato Tambara Filho
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
em Seres Humanos do Hospital de Clínicas-UFPR
CRM 3369 - Matrícula 122475

Código do recém-nascido

R337H em Parentes < 18 anos

Página 4 de 4

DECLARAÇÃO DO PARENTE COM IDADE DE 15 A 18 ANOS

Eu li (ou alguém leu para mim) o conteúdo deste formulário de consentimento e fui incentivado a fazer perguntas em relação a ele. Declaro que todas as minhas perguntas foram devidamente respondidas e que aceito participar desta pesquisa.

Nome: _____

Assinatura _____

Local e data _____

Hora _____

DECLARAÇÃO DO MÉDICO/PESQUISADOR OU DE PESSOA DESIGNADA PELO MÉDICO RESPONSÁVEL

Eu, abaixo assinado, certifico que discuti o projeto de pesquisa com o MENOR acima.

Nome: _____

Médico/pesquisador ou designado _____

Local e data _____

Hora _____

DECLARAÇÃO DA TESTEMUNHA

Eu acompanhei o processo de consentimento informado e certifico que a pesquisa, o teste de DNA, o acompanhamento proposto para as crianças, o aconselhamento genético para os adultos, os riscos, benefícios e opções de tratamento foram apresentadas ao voluntário.

Nome: _____

Testemunha _____

Local e data _____

Hora _____

DECLARAÇÃO DO GUARDIÃO (pai ou mãe)

Eu acompanhei o processo de consentimento informado e certifico que a pesquisa, o teste de DNA, o acompanhamento proposto para as crianças, o aconselhamento genético para os adultos, os riscos, benefícios e opções de tratamento foram apresentadas a(o) minha (meu) filha(o).

Nome: _____ () pai; () mãe;

Assinatura _____

Local e data _____

Hora _____

Parentesco do voluntário com o recém-nascido que teve teste positivo: () Pai; () Mãe; () Irmão; () Irmã; () Tio; () Tia; () Primo; () Prima; () Avô; () Avó; () Outro:

Observação: o MENOR só deverá fazer o teste apenas se já for confirmado que ele pertence ao lado da família de onde vem a alteração.

Em caso de perguntas ou emergências com referência a este protocolo, por favor contatar diretamente: CEGEMPAC, Rua Agostinho Leão Júnior, 400, Alto da Glória, Curitiba, PR, 80.060-240, telefone (0XX41)

(41) 9198 - 1988

Renato Tambara Filho

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
em Seres Humanos do Hospital de Clínicas-UFPR
CRM 3369 - Matrícula 122475

**ANEXO 9 - CONSENTIMENTO PARA TESTE EM PARENTES MAIORES
DE 18 ANOS DE UM RN COM A MUTAÇÃO R337H *TP53* CONFIRMADA**

Código do recém-nascido

R337H em Parentes \geq 18 anos
Página 1 de 4Consentimento para teste da mutação TP53R337H em parentes \geq 18 anos.**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****“VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA NO PARANÁ: GENOTIPAGEM, REDE INFORMATIZADA E ENCAMINHAMENTOS PARA UM CÂNCER PEDIÁTRICO HEREDITÁRIO QUE AUMENTA PROGRESSIVAMENTE NESTE ESTADO (tumor de córtex adrenal)”**

Para maiores detalhes, antes de ler este termo, aconselha-se que você leia a cartilha e assista ao vídeo, entregues aos pais do recém-nascido com a alteração no DNA. Você foi consultado(a) para realizar um exame de DNA que verificará se você é também portador(a) dessa mesma alteração (chamada mutação), a qual pode ou não aparecer em vários membros da família. Recomenda-se também que você tire todas as dúvidas com relação à pesquisa antes de assinar este termo, podendo inclusive entrar em contato direto com o coordenador desta pesquisa, Dr. Bonald C. Figuciredo por meio do telefone (0XX41) [REDACTED]. Essa mutação pode ser responsável pelo aparecimento de um tipo de tumor, que ocorre nas glândulas adrenais (situadas sobre os rins) de crianças, principalmente naquelas com menos de 4 anos.

(41) 9198-1988

Este termo de consentimento lhe dará informações sobre o estudo que será discutido com você. Assim que você entender esse estudo e, se concordar em participar dele, será solicitada sua assinatura e você receberá uma cópia do termo.

Por que este estudo está sendo realizado?

Tenho conhecimento de que a equipe está tentando descobrir quem são e onde moram os parentes do recém-nascido que apresentam a mesma alteração encontrada nele e que aqueles, portadores da mutação, receberão informações, sobre ela, e aconselhamento genético. Sei que, caso meu teste seja positivo, o risco de que eu desenvolva algum tipo de câncer é muito baixo em razão de já estar na idade adulta e que, por essa razão, receberei apenas aconselhamento e material para consultas (cartilha e vídeo).


Qual é o envolvimento deste estudo?

Estou ciente de que será coletada, de minha polpa digital, uma gota de sangue e de que essa amostra será utilizada para realizar um teste de DNA que tem como objetivo saber apenas se eu possuo ou não a mutação.

Sei que este estudo procura investigar apenas a alteração específica do DNA que causa o tumor e que o material da amostra não será utilizado para fazer nenhum outro tipo de teste, referente a outras doenças ou situações clínicas.

Quais são as consequências da desistência de continuar neste estudo?

Nenhuma. Sei que posso desistir de continuar neste estudo a qualquer momento e, caso resolva participar mais tarde, poderei me submeter ao teste.


Renato Tambara Filho
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
em Seres Humanos do Hospital de Clínicas-UFPR
CRM 3369 - Matrícula 122475

Código do recém-nascido

R337H em Parentes ≥ 18 anos
Página 2 de 4

Quais os riscos deste estudo?

Estou ciente de que, durante a coleta de sangue, poderei sentir dor devido à picada e de que há uma pequena chance de desmaio ou de sangramento no local de introdução da lanceta, localizado na polpa digital ou na orelha.

Quais são os benefícios deste estudo?

Tenho conhecimento de que as informações obtidas a partir deste estudo propiciarão à equipe um melhor entendimento sobre o tumor que aconteceu devido àquela mesma alteração no DNA e que os resultados poderão auxiliar a compreensão das chances de desenvolvimento desse tumor em algumas crianças. Entendi que, caso eu também seja portador da mutação, poderei me beneficiar de um aconselhamento quando tiver meus próprios filhos.

Que outras opções existem?

Posso escolher não participar deste estudo.

O que se sabe sobre informação nova?

Sei que tenho o direito de saber sobre os resultados deste estudo e que, se for de minha vontade saber mais sobre quando e como obter esses resultados, posso falar diretamente com o coordenador desta pesquisa, Dr. Bonald Cavalcante de Figueiredo, pelo telefone (0XX41) 3363 62 64.

O que dizer sobre confidencialidade?

Tenho conhecimento que o código de minha identidade e o resultado do teste serão armazenados separadamente em arquivos diferentes e que as informações codificadas serão guardadas no CEGEMPAC de Curitiba, sob os cuidados do Dr. Bonald C. Figueiredo.


Renato Tambara Filho
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
em Seres Humanos do Hospital de Clínicas-UFPR
CRM 3369 - Matrícula 122475


Código do recém-nascido

R337II em Parentes \geq 18 anos
Página 3 de 4**DECLARAÇÃO DE ENTENDIMENTO**

1. Eu li o texto acima e aceito de livre e espontânea vontade tomar parte neste estudo.

Tive a oportunidade de conversar abertamente com o Dr. _____, médico responsável pelo acompanhamento da primeira criança de minha família cujo teste foi positivo, sobre as razões deste estudo e em relação aos seus riscos. Tive acesso à cartilha ("Cartilha para o Diagnóstico Precoce e Cura do Tumor de Córtex Adrenal de Crianças") e ao vídeo (sobre "Detecção Precoce e Cura do Tumor de Córtex Adrenal em Crianças"), além da chance de esclarecer todas as minhas dúvidas com o coordenador desta pesquisa, Dr. Bonald C. Figueiredo.

2. Estou ciente de que este estudo poderá ter riscos, como dor provocada pela perfuração da minha polpa digital para coleta de sangue, impacto psicológico e alguma forma de transtorno ou incômodo por se tratar de uma alteração no DNA.
3. Fui informado de que é norma do CEGEMPAC não pagar para qualquer pessoa com o objetivo de que ela participe deste estudo, bem como de qualquer outro estudo realizado por essa instituição.
4. Estou ciente de que eu e meus familiares poderemos receber todo suporte da equipe desta pesquisa para eventuais problemas relacionados à coleta de sangue em minha polpa digital e caso se faça necessário o suporte de profissionais médicos e/ou psicólogos.
5. Estou ciente de que quando eu precisar esclarecer mais dúvidas a respeito deste estudo ou sobre injúrias de qualquer natureza poderei telefonar para o coordenador, Dr. Bonald C. Figueiredo, através do telefone (0XX41) 3363 62 64 (CEGEMPAC de Curitiba).
6. Sei que poderei obter mais informações sobre os meus direitos como participante deste estudo através do escritório da Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (0XX41 3360 1896 ou 0XX41 3363 2927).
7. Receberei uma cópia deste termo de consentimento.


Renato Tambara Filho
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
Seres Humanos do Hospital de Clínicas-UFPR
CRM 3369 - Matrícula 122475

Código do recém-nascido

R337H em Parentes \geq 18 anos
Página 4 de 4**DECLARAÇÃO DO PARENTE ADULTO**

Eu li (ou alguém leu para mim) o conteúdo deste formulário de consentimento e fui incentivado a fazer perguntas em relação a ele. Declaro que todas as minhas perguntas foram devidamente respondidas e que aceito participar desta pesquisa.

Nome: _____

Assinatura _____

Local e data _____

Hora _____

DECLARAÇÃO DO MÉDICO/PESQUISADOR OU DA PESSOA DESIGNADA PELO MÉDICO RESPONSÁVEL

Eu, abaixo assinado, certifico que discuti o projeto de pesquisa com o adulto acima. Expliquei todas as informações apresentadas neste termo de consentimento, incluindo os riscos de que dele podem decorrer.

Nome: _____

Médico/pesquisador ou designado _____

Local e data _____

Hora _____

DECLARAÇÃO DA TESTEMUNHA

Eu acompanhei o processo de consentimento informado e certifico que a pesquisa, o teste de DNA, o acompanhamento proposto para as crianças, o aconselhamento genético para os adultos, os riscos, benefícios e opções de tratamento foram apresentadas ao voluntário de maior idade.

Nome: _____

Testemunha _____

Local e data _____

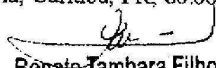
Hora _____

Parentesco do voluntário com o recém-nascido que teve teste positivo: ☐ Pai; ☐ Mãe; ☐ Irmão; ☐ Irmã; ☐ Tio; ☐ Tia; ☐ Primo; ☐ Prima; ☐ Avô; ☐ Avó; ☐ Outro:

Observação: o MENOR só deverá fazer o teste apenas se já for confirmado que ele pertence ao lado da família de onde vem a alteração.

Em caso de perguntas ou emergências com referência a este protocolo, por favor contatar diretamente: CHGEMPAC, Rua Agostinho Leão Júnior, 400, Alto da Glória, Curitiba, PR, 80.060-240, telefone (0XX41)

(41) 9198.1988


Renato Tambara Filho
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
em Seres Humanos do Hospital de Clínicas-UFPR
CRM 3369 - Matrícula 122475

ANEXO 10 - CONSENTIMENTO PARA ANÁLISE DE LOH EM CRIANÇAS

ANEXO 1

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
PARA MENORES DE 18 ANOS DE IDADE COM
DIAGNÓSTICO DE TUMOR DE CÓRTEX ADRENAL (TCA)**

1. TÍTULO DO PROJETO:

“TRIAGEM NEONATAL, MAPEAMENTO DA PREVALÊNCIA DA MUTAÇÃO *TP53* R337H POR MUNICÍPIO, HISTÓRICO DE CâNCER, PERFIL SOCIO-ECONÔMICO E ALTERAÇÕES MOLECULARES ASSOCIADAS COM TUMORES DE FAMÍLIAS DO ESTADO DO PARANÁ”


2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS DO CONVITE: É por meio de pesquisas que ocorrem os avanços na medicina, e a participação DE MENOR DE IDADE PRECISA DA APROVAÇÃO DO SEU RESPONSÁVEL LEGAL, OU DE AMBOS QUANDO O MENOR TIVER ACIMA DE 15 E MENOS DE 18 ANOS DE IDADE. *Sua criança tem ou teve tumor de córtex adrenal (TCA) e está sendo convidada a participar desse estudo. Você está sendo consultado(a) para autorizar ou não o uso de amostras de sangue e do tumor da sua criança para (1) examinar se as células do TCA em meio de cultivo e expostas a diversos tipos de estresse poderia reagir de maneira anormal em relação aos fibroblastos com e sem a mesma alteração genética; (2) verificar se ocorreu perda de uma cópia normal do gene P53 no tumor (o tumor fica apenas com a mutação R337H do gene *TP53* herdada de um dos pais); (3) estudar se houve perda de cópia do gene *IGF-2* da mãe ou do pai em amostras de TCA; (4) realizar análises de DNA (por meio de aCGH) e micro-arranjo para micro RNA (mRNA) para tentar encontrar alterações em outros genes que possam servir de indicadores de participação no início ou após a formação do tumor; (5) identificar alterações moleculares nos leucócitos da sua criança.*

Recomenda-se também que você tire todas as dúvidas com relação à pesquisa antes de assinar este termo, podendo inclusive entrar em contato direto com o coordenador desta pesquisa, Dr. Bonald C. Figueiredo por meio do telefone (41) 33101038 (Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe ou (41) 91981988.

Este termo de consentimento apresenta 5 grupos de informações descritas em 4 páginas sobre o estudo que será discutido com você. Assim que você entender e aceitar que sua criança participe deste estudo será solicitada sua assinatura na quarta página e você receberá uma cópia do termo.

3. RESPOSTAS PARA ALGUMAS PERGUNTAS OU DÚVIDAS QUE VOCÊ PODERÁ TER:**3a) Por que este estudo está sendo realizado?**

Tenho conhecimento de que a equipe está tentando descobrir como surge o TCA. Entendi que é preciso acontecer várias alterações nas células da glândula adrenal para surgir o TCA. Você precisa saber que a amostra biológica a ser analisada **NÃO SERÁ UTILIZADA PARA FORMAÇÃO DE BANCO DE AMOSTRAS, NÃO PESQUISAREMOS CÉLULAS-TRONCO**, nem faremos qualquer outro tipo de análise que não foi mencionada neste termo de consentimento.


COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA
HOSPITAL PEQUENO PRÍNCIPE

3b) Qual é o envolvimento deste estudo e quais os riscos de haver algum dano durante ou após a coleta de 5 mL de sangue do braço da minha criança e coleta de amostra do tumor descartada na sala de cirurgia da minha criança para retirar o tumor (TCA)?

Estou ciente de que será utilizada uma amostra de sangue (5mL) e parte do tumor que foi ou será retirado durante a cirurgia. Sei que este estudo procura investigar apenas as alterações no DNA citadas na primeira página deste consentimento e que o material da amostra não será utilizado para fazer nenhum outro tipo de teste, referente a outras doenças ou situações clínicas. Estou ciente de que caso aconteça algum desconforto ou dor durante a coleta de sangue do braço da minha criança o coordenador irá dar o suporte necessário para interromper o desconforto ou dor. Fui informado(a) que a cirurgia para retirada do TCA é sempre a primeira escolha do tratamento (quando for possível) e que o cirurgião apenas se encarrega de entregar um pedaço do TCA para um membro da equipe presente na sala de cirurgia, o qual se encarrega de guardar o tumor, preservando o sigilo e a ética com os dados pessoais e clínicos da sua criança. Caso estas amostras sejam extraviadas a responsabilidade será do coordenador desta pesquisa.

3c) Quais são as consequências da desistência de continuar neste estudo?

Nenhuma. Sei que posso desistir de continuar neste estudo a qualquer momento e, caso resolva participar mais tarde, poderei entrar em contato com esta equipe

3d) Quais são os benefícios deste estudo?

Tenho conhecimento de que as informações obtidas a partir deste estudo propiciarão à equipe um melhor entendimento sobre o tumor que acontece, e que os resultados poderão auxiliar a compreensão das chances de desenvolvimento desse tumor em algumas crianças.

3e) Quais os riscos deste estudo e qual o compromisso do coordenador da equipe?

Estou ciente de que minha criança poderá sentir desconforto e/ou dor ao se introduzir nela a agulha de seringa para coleta de sangue, também com uma possibilidade remota dela desmaiar. Os riscos decorrentes da perda de sigilo, ou de haver amostras extraviadas ou deterioradas são da responsabilidade do coordenador. Em qualquer situação você sempre terá o suporte necessário do coordenador da equipe deste projeto para resolver qualquer problema.

3f) Que outras opções existem?

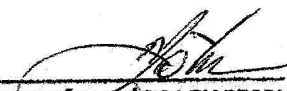
Posso escolher não participar deste estudo.

3g) O que se sabe sobre informação nova?

Sei que tenho o direito de saber sobre os resultados deste estudo e que, se for de minha vontade saber mais sobre quando e como obter esses resultados, posso falar diretamente com o coordenador desta pesquisa, Dr. Bonald Cavalcante de Figueiredo, pelo telefone (041) 33101038 (Instituto de Pesquisas Pelé Pequeno Príncipe) ou 41-91981988.

3h) O que dizer sobre confidencialidade?

Tenho conhecimento que o código de minha identidade e da minha criança, assim como os resultados de testes serão armazenados separadamente em arquivos diferentes e que as informações codificadas serão guardadas no Instituto Pelé Pequeno Príncipe, sob os cuidados do Dr. Bonald C. Figueiredo.


COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA
HOSPITAL PEQUENO PRÍNCIPE

4) DECLARAÇÃO DE ENTENDIMENTO SOBRE TUDO QUE FOI ANTERIORMENTE DESCRITO NESTE TERMO DE CONSENTIMENTO

Eu li o texto acima e aceito de livre e espontânea vontade tomar parte neste estudo.

Tive a oportunidade de conversar abertamente com o Dr. _____, médico responsável pelo tratamento da minha criança, sobre as razões deste estudo e em relação aos seus riscos. Tive a chance de esclarecer todas as minhas dúvidas com o coordenador desta pesquisa, Dr. Bonald C. Figueiredo.

Fui informado(a) de que a norma do Instituto Pelé Pequeno Príncipe é não pagar para qualquer pessoa com o objetivo de que ela participe deste estudo.


Estou ciente de que eu e meus familiares poderemos receber todo suporte da equipe desta pesquisa para eventuais problemas relacionados à coleta de sangue ou uso de parte do TCA descartado da cirurgia.

Estou ciente de que eu e meus familiares iremos receber aconselhamento genético sobre a possibilidade de acontecer câncer em crianças e adolescentes de córtex adrenal, e ainda, sobre a possibilidade de acontecer outros tipos de câncer em crianças e adultos da minha família, sempre levando em consideração ao que já foi sugerido ou indicado em resultados de pesquisas realizadas por este grupo ou qualquer outro grupo de pesquisadores sobre os riscos da mutação R337H no gene *TP53* presente em alguns membros da nossa família.

Estou ciente de que quando eu precisar esclarecer mais dúvidas a respeito deste estudo ou sobre injúrias de qualquer natureza poderei telefonar para o coordenador, Dr. Bonald C. Figueiredo, através do telefone (041) 33101038 (Instituto de Pesquisas Pelé Pequeno Príncipe) ou 41-91981988.

Sei que poderei obter mais informações sobre os meus direitos como participante deste estudo através do escritório da Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Hospital Pequeno Príncipe (41-33101010).

Receberei uma cópia deste termo de consentimento.


COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA
HOSPITAL PEQUENO PRÍNCIPE

5) DECLARAÇÃO DO PAI, MÃE OU RESPONSÁVEL LEGAL PELA CRIANÇA COM DIAGNÓSTICO DE TUMOR DE CÓRTEX ADRENAL CONSIDERANDO TUDO QUE FOI ANTERIORMENTE DESCRITO NESTE TERMO DE CONSENTIMENTO.

Projeto e objetivos:

“TRIAGEM NEONATAL, MAPEAMENTO DA PREVALÊNCIA DA MUTAÇÃO TP53 R337H POR MUNICÍPIO, HISTÓRICO DE CâNCER, PERFIL SOCIO-ECONÔMICO E ALTERAÇÕES MOLECULARES ASSOCIADAS COM TUMORES DE FAMÍLIAS DO ESTADO DO PARANÁ”

Autorização para uso de amostras de sangue e do tumor da minha criança para (1) examinar se as células do TCA em meio de cultivo e expostas a diversos tipos de estresse poderia reagir de maneira anormal em relação ao fibroblastos com e sem a mesma alteração genética; (2) verificar se ocorreu perda de uma cópia normal do gene P53 no tumor (o tumor fica apenas com a mutação R337H do gene TP53 herdada de um dos pais); (3) estudar se houve perda de cópia do gene IGF-2 da mãe ou do pai em amostras de TCA; (4) realizar análises de DNA (por meio de aCGH) e micro-arranjo para micro RNA (mRNA) para tentar encontrar alterações em outros genes que possam servir de indicadores de participação no início ou após a formação do tumor; (5) identificar alterações moleculares nos leucócitos da sua criança.

Eu li (ou alguém leu para mim) o conteúdo deste termo de consentimento (4 páginas especificando 5 itens ou grupos de informações numeradas de 1 a 5) e fui incentivado a fazer perguntas em relação a ele. Declaro nesta quarta página que todas as minhas perguntas foram devidamente respondidas e que aceito que minha criança participe desta pesquisa.

Nome da minha criança: _____
Nome do responsável legal: _____ () mãe () pai

Assinatura do responsável _____ Local e data _____ Hora _____

Assinatura do(a) menor acima de 15 anos de idade _____ Local e data _____ Hora _____

DECLARAÇÃO DO MÉDICO/PESQUISADOR OU DA PESSOA DESIGNADA PELO MÉDICO RESPONSÁVEL

Eu, abaixo assinado, certifico que discuti o projeto de pesquisa com o adulto acima. Expliquei todas as informações apresentadas neste termo de consentimento, incluindo os riscos de que dele podem decorrer. Aceito coletar 5mL de sangue da veia do braço ou antebraço de minha criança e parte do tumor de córtex adrenal dela.

Nome: _____

Médico/pesquisador ou designado _____ Local e data _____ Hora _____

DECLARAÇÃO DA TESTEMUNHA

Eu acompanhei o processo de consentimento informado e certifico que a pesquisa, o teste de DNA, o acompanhamento proposto para as crianças, o aconselhamento genético para os adultos, os riscos, benefícios e opções de tratamento foram apresentadas ao voluntário de maior idade.

Nome: _____

Testemunha _____ Local e data _____ Hora _____

Em caso de perguntas ou emergências com referência a este protocolo, por favor contatar diretamente: o Instituto de Pesquisas Pelé Pequeno Príncipe, situado à Avenida Silva Jardim, 1632, Bairro Água Verde, Curitiba, ou por meio do telefone 41-33101038.


COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA

ANEXO 11 - CONSENTIMENTO PARA ANÁLISE DE LOH EM ADULTOS

ANEXO 3

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
PARA VOLUNTÁRIO(A) ADULTO(A) PORTADOR(A) DA
ALTERAÇÃO GENÉTICA R337H NO GENE TP53 E
DIAGNOSTICADO(A) COM QUALQUER TIPO DE CÂNCER.**

1. TÍTULO DO PROJETO:

"TRIAGEM NEONATAL, MAPEAMENTO DA PREVALÊNCIA DA MUTAÇÃO TP53 R337H POR MUNICÍPIO, HISTÓRICO DE CÂNCER, PERFIL SOCIO-ECONÔMICO E ALTERAÇÕES MOLECULARES ASSOCIADAS COM TUMORES DE FAMÍLIAS DO ESTADO DO PARANÁ"

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS DO CONVITE:

É por meio de pesquisas que ocorrem os avanços na medicina, e sua participação é de fundamental importância. Você ficou sabendo por meio da pesquisa que você participou anteriormente (pesquisa da alteração genética R337H no teste do Pezinho nos recém-nascidos do Paraná) que você é portador(a) da mutação R337H no gene TP53 e está novamente sendo convidado(a) a participar deste segundo estudo. O objetivo deste segundo estudo é analisar amostra de sangue e células de qualquer tipo de câncer que você tenha tido para verificar se o câncer que você teve perdeu ou não a cópia normal do gene P53. Quando este gene normal se perde podemos acreditar que a alteração que ficou (R337H) pode ter sido a responsável pelo aparecimento do câncer que você teve.

Recomenda-se que antes de assinar esse termo você tire todas as dúvidas com relação à pesquisa, podendo inclusive entrar em contato direto com o coordenador desta pesquisa, Dr. Bonald C. Figueiredo por meio do telefone (41) 33101038.

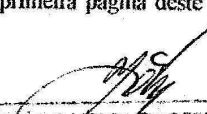
Este termo de consentimento apresenta 5 grupos de informações descritas em 4 páginas sobre o estudo que será discutido com você. Assim que você entender e aceitar participar deste estudo será solicitada sua assinatura na quarta página e você receberá uma cópia do termo.

3. RESPOSTAS PARA ALGUMAS PERGUNTAS OU DÚVIDAS QUE VOCÊ PODERÁ TER:**3a) Por que este estudo está sendo realizado?**

Como ainda não se sabe se a mutação R337H do TP53 causaria outros tipos de câncer (além do tumor de córtex adrenal de crianças), fui informado(a) que a equipe está trabalhando para descobrir quem são, onde moram e que tipo de câncer teriam os portadores da mutação R337H. As informações obtidas nesse estudo poderão no futuro, auxiliar em novas formas de se diagnosticar e tratar esse tumor. Você precisa saber que a amostra biológica a ser analisada **NÃO SERÁ UTILIZADA PARA FORMAÇÃO DE BANCO DE AMOSTRAS, NÃO PESQUISAREMOS CÉLULAS-TRONCO**, nem faremos qualquer outro tipo de análise que não foi mencionada neste termo de consentimento.

3b) Qual é o envolvimento deste estudo?

Estou ciente de que será utilizada uma amostra de sangue (5mL) e parte do tumor que foi ou será retirado durante a cirurgia. Sei que este estudo procura investigar apenas as alterações no DNA citadas na primeira página deste


COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA
HOSPITAL PEQUENO PRÍNCIPE

consentimento e que o material da amostra não será utilizado para fazer nenhum outro tipo de teste, referente a outras doenças não cancerosas.

As análises moleculares a serem realizadas nas amostras do meu sangue e do meu tumor serão exclusivamente para identificar se a cópia do gene *P53* normal foi perdida no tumor. O sangue será obtido por meio de punção de veia periférica (veia superficial do meu braço ou antebraço), enquanto um fragmento do tumor é obtido do material do tumor descartado da minha cirurgia.

3c) Quais são as consequências da desistência de continuar neste estudo?

Nenhuma. Sei que posso desistir de continuar neste estudo a qualquer momento e, caso resolva participar mais tarde, poderei me submeter ao teste.

3d) Quais são os benefícios deste estudo?

Tenho conhecimento de que as informações obtidas a partir deste estudo poderão esclarecer se a mutação R337H causaria qualquer tipo de tumor, ou outro tipo de tumor além do tumor de córtex adrenal de crianças.

3e) Quais os riscos deste estudo durante ou após a coleta de 5 mL de sangue do meu braço e coleta de amostra do tumor descartada na sala de cirurgia e qual o compromisso do coordenador da equipe?

Estou ciente de que minha criança poderá sentir desconforto e/ou dor ao se introduzir nela a agulha de seringa para coleta de sangue, e também existe a possibilidade remota dela desmaiar. Os riscos decorrentes da perda de sigilo, ou de haver amostras extraviadas ou deterioradas são da responsabilidade do coordenador. Estou ciente de que caso aconteça algum desconforto ou dor durante a coleta de sangue do meu braço o coordenador irá dar o suporte necessário para interromper o desconforto ou dor. Fui informado(a) que esta equipe não teve nenhuma participação na cirurgia para retirada do tumor e que o cirurgião apenas pode permitir entregar um pedaço do tumor para um membro da equipe presente na sala de cirurgia ou a amostra do tumor poderá ser obtida do laboratório de patologia (guardado em blocos de parafina). Caso sobre algum material biológico, a equipe desta pesquisa se encarregará de devolver ao setor responsável pela amostra, preservando o sigilo e a ética com os seus dados pessoais e clínicos. Caso estas amostras sejam extraviadas a responsabilidade será do coordenador desta pesquisa.

3f) Que outras opções existem?

Posso escolher não participar deste estudo.

3g) O que se sabe sobre informação nova?

Sei que tenho o direito de saber sobre os resultados deste estudo e que, se for de minha vontade saber mais sobre quando e como obter esses resultados, posso falar diretamente com o coordenador desta pesquisa, Dr. Bonald Cavalcante de Figueiredo, pelo telefone (41) 331010358.

3h) O que dizer sobre confidencialidade?

Tenho conhecimento que o código de minha identidade e o resultado do teste serão armazenados separadamente em arquivos diferentes e que as informações codificadas serão guardadas no Instituto Pelé Pequeno Príncipe de Curitiba, sob os cuidados do Dr. Bonald C. Figueiredo.


COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA
HOSPITAL PEQUENO PRÍNCIPE

4) DECLARAÇÃO DE ENTENDIMENTO SOBRE TUDO QUE FOI ANTERIORMENTE DESCRITO NESTE TERMO DE CONSENTIMENTO

Eu li (ou alguém leu para mim) o texto acima e aceito de livre e espontânea vontade tomar parte neste estudo.

Tive a oportunidade de conversar abertamente com o Dr. _____, médico responsável. Tive a chance de esclarecer todas as minhas dúvidas com o coordenador desta pesquisa, Dr. Bonald C. Figueiredo.

Fui informado de que é norma do Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe não pagar para qualquer pessoa com o objetivo de que ela participe deste estudo, bem como de qualquer outro estudo realizado por essa instituição.


Estou ciente de que eu poderei receber todo suporte da equipe desta pesquisa para eventuais problemas relacionados à coleta de meu sangue ou da coleta de um pedaço do meu tumor descartado da minha cirurgia. Caso se faça necessário, terei o suporte de profissionais médicos e/ou psicólogos.

Estou ciente de que eu e meus familiares iremos receber aconselhamento genético sobre a possibilidade de acontecer câncer em crianças e adolescentes de córtex adrenal, e ainda, sobre a possibilidade de acontecer outros tipos de câncer em crianças e adultos da minha família, sempre levando em consideração ao que já foi sugerido ou indicado em resultados de pesquisas realizadas por este grupo ou qualquer outro grupo de pesquisadores sobre os riscos da mutação R337H no gene TP53 presente em alguns membros da nossa família.

Estou ciente de que quando eu precisar esclarecer mais dúvidas a respeito deste estudo ou sobre injúrias de qualquer natureza poderei telefonar para o coordenador, Dr. Bonald C. Figueiredo, através do telefone (41) 33101038 (Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe).

Sei que poderei obter mais informações sobre os meus direitos como participante deste estudo através do escritório da Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Hospital Pequeno Príncipe (41-33101010).

Receberei uma cópia deste termo de consentimento.


COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA
HOSPITAL PEQUENO PRÍNCIPE

5) DECLARAÇÃO DO VOLUNTÁRIO(A) ADULTO(A) PORTADOR(A) DA MUTAÇÃO R337H NO GENE TP53 E DIAGNOSTICADO(A) COM QUALQUER TIPO DE CÂNCER, CONSIDERANDO TUDO QUE FOI ANTERIORMENTE DESCRITO NESTE TERMO DE CONSENTIMENTO.

Projeto e objetivo:

"TRIAGEM NEONATAL, MAPEAMENTO DA PREVALÊNCIA DA MUTAÇÃO TP53 R337H POR MUNICÍPIO, HISTÓRICO DE CÂNCER, PERFIL SOCIO-ECONÔMICO E ALTERAÇÕES MOLECULARES ASSOCIADAS COM TUMORES DE FAMÍLIAS DO ESTADO DO PARANÁ"

Estou ciente de que o objetivo deste estudo é analisar amostra de sangue e células de qualquer tipo de câncer que eu tenha tido para verificar se o câncer perdeu a cópia normal do gene P53.

Eu li (ou alguém leu para mim) o conteúdo deste termo de consentimento (4 páginas especificando 5 itens ou grupos de informações numeradas de 1 a 5) e fui incentivado a fazer perguntas em relação a ele. Declaro nesta quarta página que todas as minhas perguntas foram devidamente respondidas e que aceito participar desta pesquisa.

Nome: _____

Assinatura _____

Local e data _____

Hora _____

DECLARAÇÃO DO MÉDICO/PESQUISADOR OU DA PESSOA DESIGNADA PELO MÉDICO RESPONSÁVEL

Eu, abaixo assinado, certifico que discuti o projeto de pesquisa com o adulto acima. Expliquei todas as informações apresentadas neste termo de consentimento, incluindo os riscos de que dele podem decorrer.

Nome: _____

Médico/pesquisador ou designado _____

Local e data _____

Hora _____

DECLARAÇÃO DA TESTEMUNHA

Eu acompanhei o processo de consentimento informado e certifico que a pesquisa, o teste de DNA, o acompanhamento proposto para as crianças, o aconselhamento genético para os adultos, os riscos, benefícios e opções de tratamento foram apresentadas ao voluntário de maior idade.


Nome: _____

Testemunha _____

Local e data _____

Hora _____

Em caso de perguntas ou emergências com referência a este protocolo, por favor contatar diretamente o Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe pelo telefone 41-33101038.


COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA
HOSPITAL PEQUENO PRÍNCIPE

**ANEXO 12 - CONSENTIMENTO PARA ANÁLISE DE LOH EM CRIANÇAS
DIAGNOSTICADAS COM OUTROS TIPOS DE TUMORES**

ANEXO 4

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
PARA VOLUNTÁRIO(A) COM IDADE ABAIXO DE 18 ANOS,
PORTADOR(A) DA ALTERAÇÃO GENÉTICA R337H NO
GENE TP53 E DIAGNOSTICADO(A) COM TUMOR DE
WILMS OU QUALQUER TIPO DE CÂNCER.**

1. TÍTULO DO PROJETO:

"TRIAGEM NEONATAL, MAPEAMENTO DA PREVALÊNCIA DA MUTAÇÃO TP53 R337H POR MUNICÍPIO, HISTÓRICO DE CÂNCER, PERFIL SOCIO-ECONÔMICO E ALTERAÇÕES MOLECULARES ASSOCIADAS COM TUMORES DE FAMÍLIAS DO ESTADO DO PARANÁ"

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS DO CONVITE:

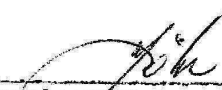
Você foi convidado(a) para permitir que sua criança participe deste estudo por dois motivos: (1) o motivo pode ser porque sua criança não tem mutação R337H mas vai ser submetida à cirurgia para retirar tumor de Wilms e o cirurgião vai precisar retirar e descartar também a glândula adrenal, OU (2) o segundo motivo SERIA porque você ficou sabendo por meio da pesquisa que você participou anteriormente (pesquisa da mutação nos recém-nascidos do Paraná) que sua criança é portadora da mutação R337H no gene TP53 e está novamente sendo convidada a participar deste segundo estudo porque apresenta ou apresentou algum tipo de câncer ou tumor que não é o tumor de córtex adrenal. Se você foi convidado(a) porque sua criança teve ou tem o tumor de Wilms, o objetivo da participação da sua criança nesta pesquisa é para que você autorize que nossa equipe utilize a glândula adrenal (ou supra-renal) que poderá ser descartada da cirurgia para fins de comparação com resultados obtidos com os tumores de córtex adrenal. Porém, se você foi convidado(a) pelo segundo motivo, iremos analisar a amostra de sangue e células de qualquer tipo de câncer que sua criança tem ou teve para verificar se o câncer perdeu a cópia normal do gene P53.

Recomenda-se que antes de assinar esse termo você tire todas as dúvidas com relação à pesquisa, podendo inclusive entrar em contato direto com o coordenador desta pesquisa, Dr. Bonald C. Figueiredo por meio do telefone (41) 33101038.

Este termo de consentimento apresenta 5 grupos de informações descritas em 4 páginas sobre o estudo que será discutido com você. Assim que você entender e aceitar que sua criança participe deste estudo será solicitada sua assinatura na quarta página e você receberá uma cópia do termo.

3. RESPOSTAS PARA ALGUMAS PERGUNTAS OU DÚVIDAS QUE VOCÊ PODERÁ TER:**3a) Por que este estudo está sendo realizado?**

Como ainda não se sabe se a alteração genética R337H do TP53 causaria outros tipos de câncer (além do tumor de córtex adrenal de crianças), fui informado(a) que a equipe está trabalhando para descobrir quem são, onde moram e que tipo de câncer teriam os portadores da mutação R337H. As informações obtidas nesse estudo poderão no futuro, auxiliar em novas formas de se diagnosticar e tratar esse tumor. Você precisa saber que a amostra biológica a ser analisada **NÃO SERÁ UTILIZADA PARA FORMAÇÃO DE BANCO DE AMOSTRAS, NÃO PESQUISAREMOS CÉLULAS-TRONCO**, nem faremos qualquer outro tipo de análise que não foi mencionada neste termo de consentimento.


COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA
HOSPITAL PEQUENO PRÍNCIPE

3b) Qual é o envolvimento deste estudo?

Estou ciente de que será utilizada uma amostra de sangue (5mL) com parte do tumor que foi ou será retirado durante a cirurgia, ou se trata de uso da glândula adrenal descartada da cirurgia que sua criança foi obrigada a fazer para retirar tumor de Wilms. Sei que este estudo procura investigar apenas as alterações citadas na primeira página deste consentimento e que o material da amostra não será utilizado para fazer nenhum outro tipo de teste, referente a outras doenças não cancerosas.

3c) Quais são as consequências da desistência de continuar neste estudo?

Nenhuma. Sei que posso desistir de continuar participação da minha criança neste estudo a qualquer momento e, caso resolva participar mais tarde, poderei me submeter ao teste.

3d) Quais são os benefícios deste estudo?

Tenho conhecimento de que as informações obtidas a partir deste estudo poderão esclarecer se a mutação R337H causaria qualquer tipo de tumor.

3e) Quais os riscos de haver algum dano durante ou após a coleta de 5 mL de sangue do braço da minha criança e coleta de amostra de tumor ou glândula descartada na sala de cirurgia da minha criança?

Estou ciente de que caso aconteça algum desconforto ou dor durante a coleta de sangue do braço da minha criança o coordenador irá dar o suporte necessário para interromper o desconforto ou dor. Fui informado(a) que o coordenador desta pesquisa não participa de decisões sobre a cirurgia para retirada de tumor da minha criança (quando for possível) e que o cirurgião apenas se encarregaria de entregar um pedaço do tumor ou entregaria a glândula adrenal para um membro da equipe presente na sala de cirurgia, ou poderemos pegar amostra do tumor em bloco de parafina arquivado no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital. **Em qualquer situação, depois de concluir as análises, o resto material biológico será devolvido ao local de onde veio (bloco de parafina) ou será incinerado (se saiu da sala de cirurgia).** Serão preservados o sigilo e a ética com os dados pessoais, resultados da pesquisa e dados clínicos da sua criança. Caso estas amostras sejam extraviadas a responsabilidade será do coordenador desta pesquisa.

3f) Que outras opções existem?

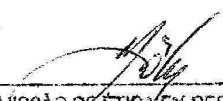
Posso escolher não participar deste estudo.

3g) O que se sabe sobre informação nova?

Sei que tenho o direito de saber sobre os resultados deste estudo e que, se for de minha vontade saber mais sobre quando e como obter esses resultados, posso falar diretamente com o coordenador desta pesquisa, Dr. Bonald Cavalcante de Figueiredo, pelo telefone (41) 33101038.

3h) O que dizer sobre confidencialidade?

Tenho conhecimento que o código de minha identidade, da identidade de minha criança e do resultado do teste serão armazenados separadamente em arquivos diferentes e que as informações codificadas serão guardadas no Instituto Pelé Pequeno Príncipe de Curitiba, sob os cuidados do Dr. Bonald C. Figueiredo.


COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA
HOSPITAL PEQUENO PRÍNCIPE

4) DECLARAÇÃO DE ENTENDIMENTO SOBRE TUDO QUE FOI ANTERIORMENTE DESCRITO NESTE TERMO DE CONSENTIMENTO

Eu li (ou alguém leu para mim) o texto acima e aceito de livre e espontânea vontade que minha criança tome parte neste estudo.

Tive a oportunidade de conversar abertamente com o Dr. _____, médico responsável. Tive a chance de esclarecer todas as minhas dúvidas com o coordenador desta pesquisa, Dr. Bonald C. Figueiredo.

Fui informado(a) de que é norma do Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe não pagar para qualquer pessoa com o objetivo de que ela participe deste estudo, bem como de qualquer outro estudo realizado por essa instituição.


Estou ciente de que eu poderei receber todo suporte da equipe desta pesquisa para eventuais problemas relacionados à coleta de sangue ou da coleta de um pedaço do tumor da minha criança descartado da cirurgia. Caso se faça necessário, minha criança terá o suporte de profissionais médicos e/ou psicólogos.

Estou ciente de que eu e meus familiares iremos receber aconselhamento genético sobre a possibilidade de acontecer câncer em crianças e adolescentes de córtex adrenal, e ainda, sobre a possibilidade de acontecer outros tipos de câncer em crianças e adultos da minha família, sempre levando em consideração ao que já foi sugerido ou indicado em resultados de pesquisas realizadas por este grupo ou qualquer outro grupo de pesquisadores sobre os riscos da mutação R337H no gene *TP53* presente em alguns membros da nossa família.

Estou ciente de que quando eu precisar esclarecer mais dúvidas a respeito deste estudo ou sobre injúrias de qualquer natureza poderei telefonar para o coordenador, Dr. Bonald C. Figueiredo, através do telefone (41) 331010358 (Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe).

Sei que poderei obter mais informações sobre os meus direitos como participante deste estudo através do escritório da Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Hospital Pequeno Príncipe (41-33101010).

Receberei uma cópia deste termo de consentimento.


COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA
HOSPITAL PEQUENO PRÍNCIPE

5) DECLARAÇÃO DO RESPONSÁVEL PELO VOLUNTÁRIO(A) COM IDADE ABAIXO DE 18 ANOS DE IDADE COM A ALTERAÇÃO GENÉTICA R337H NO GENE *TP53* E DIAGNOSTICADO(A) COM TUMOR DE WILMS OU QUALQUER TIPO DE CÂNCER, CONSIDERANDO TODAS AS INFORMAÇÕES APRESENTADAS NESTE TERMO

Projeto e objetivos:

“TRIAGEM NEONATAL, MAPEAMENTO DA PREVALÊNCIA DA MUTAÇÃO *TP53* R337H POR MUNICÍPIO, HISTÓRICO DE CÂNCER, PERFIL SOCIO-ECONÔMICO E ALTERAÇÕES MOLECULARES ASSOCIADAS COM TUMORES DE FAMÍLIAS DO ESTADO DO PARANÁ”

Estou ciente de que o objetivo deste estudo é analisar amostra de sangue e células de qualquer tipo de câncer que minha criança tenha tido para verificar se o câncer perdeu a cópia normal do gene *P53*.

Eu li (ou alguém leu para mim) o conteúdo deste termo de consentimento (4 páginas especificando 5 itens ou grupos de informações numeradas de 1 a 5) e fui incentivado a fazer perguntas em relação a ele. Declaro nesta quarta página que todas as minhas perguntas foram devidamente respondidas e que aceito participar desta pesquisa doando 5mL do sangue periférico de veia do braço ou antebraço e parte do tumor de minha criança.

Nome da criança: _____
Nome do responsável legal: _____

Assinatura do responsável	Local e data	Hora
Nome da criança		

Assinatura do(a) menor acima de 15 anos de idade	Local e data	Hora
--	--------------	------

DECLARAÇÃO DO MÉDICO/PESQUISADOR OU DA PESSOA DESIGNADA PELO MÉDICO RESPONSÁVEL

Eu, abaixo assinado, certifico que discuti o projeto de pesquisa com o adulto acima. Expliquei todas as informações apresentadas neste termo de consentimento, incluindo os riscos de que dele podem decorrer.

Nome: _____

Médico/pesquisador ou designado	Local e data	Hora
---------------------------------	--------------	------


DECLARAÇÃO DA TESTEMUNHA

Eu acompanhei o processo de consentimento informado e certifico que a pesquisa, o teste de DNA, o acompanhamento proposto para as crianças, o aconselhamento genético para os adultos, os riscos, benefícios e opções de tratamento foram apresentadas ao voluntário de maior idade.

Nome: _____

Testemunha	Local e data	Hora
------------	--------------	------

Em caso de perguntas ou emergências com referência a este protocolo, por favor contatar diretamente o Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe pelo telefone 41-33101038.


**COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA
HOSPITAL PEQUENO PRÍNCIPE**

